

Anaerobe und Pathogen-induzierte Resistenzgenexpression in transgenen Kartoffeln

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Lorenz Bülow

aus Chiclayo / Peru

1. Referent: PD Dr. Klaus Düring

2. Referent: PD Dr. Reinhard Hehl

eingereicht am: 26.10.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.12.2000

Druckjahr: 2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor / die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Bülow, L., Köhler, U., Cerff, R., Hehl, R., Düring, K.: Induction of the Maize GapC4 Promotor in Transgenic Potato under Anaerobiosis and in *Erwinia carotovora*-Inoculated Tuber Tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 182-188 (1999)

Tagungsbeiträge:

Bülow, L., Köhler, U., Geffers, R., Cerff, R., Düring, K., Hehl, R.: Molekulare Untersuchung und biotechnologische Anwendung eines anaerob induzierbaren Mais-Promotors in dikotylen Pflanzen. Vortrag. 10. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", 5.-8.3.1997, Wernigerode (1997)

Porsch, P., Bülow, L.: Development of genetic engineering strategies for resistance to phytopathogenic bacteria. Vortrag. Workshop "Development and use of transgenic potatoes resistant to bacterial diseases", 24.-26.11.1998, Lima, Peru (1998)

Porsch, P., Mahn, A., Jahnke, A., Bülow, L., Düring, K.: Antibakterielle Resistenzzüchtung in transgenen Lysozymkartoffeln. Posterbeitrag. 3. GPZ-Tagung, 28.-29.2.1996, Köln (1996)

Mahn, A., Porsch, P., Bülow, L., Geffers, W., Düring, K.: Pathogen resistance in T4 lysozyme expressing potato. Posterbeitrag. 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27.9.1997, Singapore (1997)

Porsch, P., Mahn, A., Bülow, L., Düring, K.: A T4 lysozyme toolkit for resistance engineering in potatoes towards *Erwinia carotovora*. Posterbeitrag. 5th International Symposium on the Molecular Biology of the Potato. 2.-6.8.1998, Bogensee (1998)

Hehl, R., Geffers, R., Bülow, L., Cerff, R., Düring, K.: Heterologe anaerobe Genexpression: Signalkomponenten und biotechnologische Anwendung. Posterbeitrag. 12. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", 3.-6.3.1999, Dabringhausen (1999)

Hehl, R., Bülow, L., Köhler, U., Cerff, R., Düring, K.: Induction of the maize GapC4 promotor in transgenic potato under anaerobiosis and in *Erwinia carotovora*-inoculated tuber tissue. Abstract und Posterbeitrag. XVI. International Botanical Congress, 1.-7.8.1999, St. Louis, USA (1999)

1	Einleitung	1
1.1	Krankheitserreger und Schädlinge der Kartoffel	2
1.2	Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule	8
1.3	Die Pathogenabwehr der Pflanze	11
1.4	Gentechnische Resistenzstrategien	12
1.5	Anaerob induzierbare Promotoren	15
1.6	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Enzyme	20
2.2	Verwendete Konstrukte	20
2.2.1	35S-GUS in pOCA28	20
2.2.2	<i>GapC4</i> -GUS in pOCA28	20
2.2.3	promotorlos-GUS in pOCA28	21
2.2.4	pOCA28	21
2.2.5	<i>GapC4-lys</i> in pSR8-39	21
2.2.6	<i>GapC4-lys</i> in pOCA28	23
2.2.7	Übersicht über die verwendeten Konstrukte	23
2.3	Agrobakterientransformation	24
2.4	Kartoffeltransformation	24
2.5	Nachweis persistierender Agrobakterien	25
2.6	Knollenproduktion	26
2.7	Anaerobiose	26
2.8	Histochemischer GUS Test mit Blättern, Stengeln und Wurzeln	27
2.9	Histochemischer GUS Test mit Gewächshausknollen nach aerober und anaerober Inkubation	27
2.10	Histochemischer GUS Test mit Gewächshausknollen nach Infektion mit <i>Erwinia carotovora</i>	28
2.11	Fluorimetrischer GUS Test	29
2.12	Teilweise Mazeration von Knollenscheiben	30
2.13	Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase im Knollengewebe	30
2.14	Herstellung eines <i>Erwinia</i> -Extrakts	31
2.15	Herstellung eines Extrakts aus <i>Erwinia</i> -infizierten Knollenscheiben	31
2.16	Knollenscheibentests mit <i>Erwinia</i> -Extrakten und aufgereinigten pektolytischen Enzymen	32
2.17	Inaktivierung pektolytischer Enzyme	33
2.18	Herstellung von Oligogalakturoniden aus Polypektat und Pektin	33
2.19	Knollenscheibentest mit Oligogalakturoniden	34
2.20	Resistenztest	34
2.21	Northern Blot	35
2.22	Abkürzungen	36

3	Ergebnisse	38
3.1	Aktivität des CaMV 35S Promotors in der Kartoffel unter anaeroben Bedingungen	38
3.2	Kartoffeltransformation mit den GUS-Konstrukten und Kontrollplasmiden	39
3.3	Histochemischer GUS-Test mit Blättern, Stengeln und Wurzeln nach anaerober Inkubation	40
3.4	Histochemischer GUS-Test mit Knollenscheiben nach anaerober Inkubation	43
3.5	Histochemischer GUS-Test mit Knollenscheiben nach Infektion mit <i>Erwinia carotovora</i>	43
3.6	Fluorimetrische GUS-Tests	45
3.7	Teilweise Mazeration von Knollenscheiben	49
3.8	Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase	52
3.9	Promotorinduktion durch <i>Erwinia</i> -Extrakte und aufgereinigte pektolytische Enzyme	54
3.10	Inaktivierung pektolytischer Enzyme	56
3.11	Knollenscheibentest mit Oligogalakturoniden	57
3.12	Herstellung von <i>GapC4-lys</i> Pflanzen	58
3.13	Resistenztests	59
4	Diskussion	67
4.1	Anaerobe Induktion	68
4.2	Induktion durch <i>Erwinia</i>	71
4.3	Induktion durch pektolytische Enzyme	72
4.4	Resistenztests	74
4.5	Induktionsstimuli	76
4.6	Ausblick	77
5	Zusammenfassung	80
6	Literatur	82

1 Einleitung

Die Kartoffel stammt aus den Anden Südamerikas, wo noch heute zahlreiche knollenbildende Wildformen vorkommen (Franke, 1989). Das Heimatgebiet der Kulturkartoffel liegt in Peru und Bolivien im Bereich der Hochanden um den Titicacasee (Salaman, 1954; Hawkes, 1944). Von welchen Wildarten die kultivierte Kartoffel abstammt, ist noch nicht eindeutig sicher (Rothacker, 1961), doch vermutlich hat *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* den Ursprung für unsere Kulturform *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* geliefert (Franke, 1980). Als Pizarro 1526 in die Andenländer vordrang, lernte er die Kartoffel als dortige Kulturpflanze der Indianer kennen. Zwischen 1540 und 1565 gelangten die ersten rotschaligen Kartoffeln mit großen violetten Blüten nach Europa, zunächst nach Spanien, wo zwischen 1560 und 1570 die ersten Anpflanzungen in der Nähe der Anlaufhäfen entstanden. Unabhängig von der Einfuhr nach Spanien gelangten im Jahr 1565 gelbschalige Kartoffeln mit weißen oder violetten Blüten aus Santa Fe im östlichen Venezuela nach England (Brücher, 1975). Die hiesigen Kartoffeln sind somit auf Einfuhren von lediglich zwei Landsorten aus zwei verschiedenen Gebieten zurückzuführen (Körber-Grohne, 1987). Beide Gruppen von Landsorten vermischten sich dann in Europa, wo sie in der zweiten Hälfte des 16. Jahrhunderts zunächst als Heil- und Gewürzpflanzen von Ärzten und Apothekern in Gärten gezüchtet wurden. Erst gegen Ende des 18. Jahrhunderts gelang der Kartoffel, insbesondere in Preußen unter Friedrich II., der Durchbruch als allgemeines Nahrungsmittel. Die Kartoffelzüchter standen zu diesem Zeitpunkt jedoch noch vor einigen Problemen. Nicht nur, daß die unregelmäßigen Knollen große, tiefliegende Augen aufwiesen, sondern vor allem der kratzige und brennende Geschmack der Knollen aufgrund des damals noch höheren Gehalts an Solanin schmälerte die Akzeptanz der Kartoffel als Nahrungsmittel. Eine weitere Schwierigkeit betraf die Tatsache, daß die an den tropischen Kurztag gewöhnten Pflanzen im europäischen Langtag zwar meterlange Ausläufer, jedoch kaum Knollen ausbildeten. Die damaligen Kartoffelzüchter waren folglich darauf bedacht, in erster Linie Form, Geschmack und Ertrag zu verbessern. Vermutlich wurde damals kein besonderes Augenmerk auf die Züchtung resistenter Sorten gelegt, was dazu führte, daß die natürlichen Resistenzen gegen die Krankheiten und Parasiten, welche in den südamerikanischen Wildformen der Kartoffel noch anzutreffen sind, durch die züchterische Tätigkeit verloren gingen. Folglich traten die ersten schweren Kartoffelseuchen auf, nachdem

die Kartoffel von Beginn des 19. Jahrhunderts an in ganz Europa eine wichtige Nahrungsgrundlage geworden war. In Irland wirkten sich die von *Phytophthora infestans* verursachten Kraut- und Knollenfäuleepidemien in den Jahren 1845 und 1848 so verheerend aus, daß wegen der Hungersnöte Hunderttausende von Iren gezwungen waren, nach Amerika auszuwandern. In Deutschland vernichtete später dieselbe Seuche ganze Erntebestände und verursachte 1917/18 im letzten Jahr des Ersten Weltkriegs den legendären „Steckrübenwinter“, als die Bevölkerung in Folge der Hungersnot gezwungen war, sich von Kohlrüben zu ernähren. Heutzutage treten zwar durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln keine Epidemien mehr auf, doch die Verluste durch Pflanzenkrankheiten sind nach wie vor enorm, sie machen schätzungsweise 22% des potentiellen Ertrags aus (Cramer, 1967). Dies zeigt die ökonomische Bedeutung der Kartoffelkrankheiten und erklärt, daß der Resistenzzüchtung eine immer wichtigere Rolle zukommt.

1.1 Krankheitserreger und Schädlinge der Kartoffel

Aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung und des oft sehr konzentrierten Anbaus wird die Kartoffelstaude von zahlreichen Krankheitserregern und Schädlingen befallen, die es in ihrer Heimat nicht gibt. Dazu kommt, daß die Kartoffel nicht nur während des Wachstums, sondern auch während der Lagerung anfällig für Krankheiten ist. Regional ist das Erscheinen von Kartoffelkrankheiten und Schädlingen und somit die Verlustquote beim Kartoffelanbau sehr unterschiedlich, was einerseits auf das Vorkommen und die Anpassung der Erreger an die herrschenden klimatischen Bedingungen und andererseits auf die unterschiedlichen Anbau- und Lagerpraktiken zurückzuführen ist.

Die wichtigsten Schädlinge der Kartoffel sind Nematoden, Kartoffelkäfer und Blattläuse. Bei den Nematoden handelt es sich um im Boden lebende Fadenwürmer, die in die jungen Wurzelhaare der Kartoffelpflanzen eindringen und diese hauptsächlich durch massiven Befall und Nährstoffentzug schädigen. Die Bekämpfung der Nematoden beruht auf der chemischen Entseuchung der Böden mit Nematiziden, dem Anbau von nematodenresistenten Sorten und dem Einsatz von insektenpathogenen Pilzen und Bakterien mit antagonistischer Wirkung (Rössner, 1987; Sikora et al., 1990). Die Bedeutung des Kartoffelkäfers als Schädling der Kartoffel beruht vorwiegend auf den enormen Fraßschäden, welche die Larven an den Blättern verursachen. Zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers kommt hauptsächlich chemischer

Pflanzenschutz zur Anwendung (Bongers, 1975). Es ist jedoch auch gelungen, transgene Kartoffeln mit erhöhter Resistenz durch die Expression des Endotoxins aus *Bacillus thuringiensis tenebrionis* zu erzeugen (Adang et al., 1993; Donegan et al., 1996; Peferoen, 1997; Perlak et al., 1993). Blattläuse können die Kartoffelpflanze zwar direkt durch Saugen schädigen (Kolbe, 1970), doch darin liegt nicht ihre Hauptbedeutung, der eigentliche Schaden entsteht indirekt, indem Viren durch die Blattläuse übertragen werden. Die grüne Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* ist der weltweit betrachtet leistungsfähigste Virusvektor, da die Laus weit über 100 verschiedene Viren überträgt (van Emden et al., 1979). Darunter befinden sich viele Kartoffelviren, beispielsweise Kartoffelblattroll-Virus, die Kartoffelviren A, Y und M sowie das Acuba-Mosaik-Virus. Der verursachte Schaden durch Viren, die von Blattläusen übertragen werden, ist an Kartoffelpflanzen so erheblich, daß diese als die bedeutendsten tierischen Schädlinge angesehen werden können. Die Bekämpfung der Blattläuse erfolgt chemisch, hierfür stehen eine Reihe von Insektiziden zur Verfügung (Rieckmann, 1991). Zu den wichtigsten viralen Krankheitserregern der Kartoffel gehören das Kartoffelblattrollvirus, die Kartoffelviren Y, A, X, S und M das sowie Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd. Das Kartoffelblattrollvirus, PLRV, wird über den Vektor Blattlaus übertragen und ist in praktisch allen Kartoffelanbaugebieten der Welt zu finden. Es verursacht die Blattrollkrankheit, welche sich bei der Kartoffelpflanze durch Einrollen der Blätter von der Seite her nach oben hin bemerkbar macht und zu einem verminderten Knollenertrag von bis zu 87% führt (Barker, 1992; Harrison, 1984). Die direkte Bekämpfung von PLRV durch Wärmetherapie infizierter Knollen hat kaum praktische Bedeutung. Wichtiger sind indirekte Maßnahmen wie die Bekämpfung des Überträgers und die Verwendung resistenten Pflanzguts. Es gibt eine Reihe resistenter Sorten sowie die Möglichkeit, mittels Gentechnik resistente Pflanzen zu erzeugen. Transgene Pflanzen, die das PLRV Hüllprotein exprimieren, erwiesen sich als weniger anfällig und zeigten eine starken Reduzierung ihres Virusgehalts sowie eine deutliche Verminderung der Virusübertragungsfähigkeit durch Blattläuse (Presting et al., 1995). Das Kartoffelvirus Y, PVY, kommt ebenfalls in so gut wie allen Anbaugebieten der Erde vor. Es tritt in Abhängigkeit vom Klima, dem Resistenzgrad der angebauten Sorten und dem Vorkommen seiner Vektoren in Abständen von einigen Jahren epidemisch auf. Die Bekämpfung erfolgt indirekt durch den Anbau resistenter Sorten, durch die Verwendung von gesundem Pflanzgut und durch die Bekämpfung der Vektoren mit Hilfe von Insektiziden (De

Bokx und Huttinga, 1981). Es ist darüber hinaus gelungen, gentechnisch veränderte Kartoffeln zu erzeugen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber PVY aufweisen (Malnoe et al., 1994; Lawson et al., 1990). Da das Kartoffelvirus X, PVX, nicht durch Blattläuse übertragen wird, sondern nahezu ausschließlich über den Kontakt von Pflanzenteilen, liegt der Schwerpunkt der Bekämpfung des Erregers im Anbau von nicht infizierten Knollen sowie in der Verwendung von resistenten Sorten (Bercks, 1970). Auch für diese Krankheit konnten durch die Expression des PVX Hüllproteins in transgenen Kartoffeln resistenterere Pflanzen erzeugt werden (Xu et al., 1995; Jongedijk et al., 1992; van den Elzen et al., 1989). Die Bedeutung der Kartoffelviren A, S und M ist, wenn sie einzeln auftreten, eher gering, doch können Mischinfektionen zu erheblichen Schäden und Ernteverlusten führen. Da diese Viren hauptsächlich durch Blattläuse übertragen werden, erfolgt deren Bekämpfung einerseits mit Hilfe von Insektiziden und andererseits durch den Anbau von gesundem Pflanzgut und resistenten Sorten (Bartels, 1971; Rozendaal und Brust, 1954; Rozendaal und van Slogteren, 1957; Weidemann, 1986). Das Viroid PSTVd ruft bei Kartoffeln die Spindelknollenkrankheit hervor, welche sich in spindelförmig deformierten und rissigen Knollen äußert und Ertragseinbußen von bis zu 40% zur Folge haben kann. Die Übertragung des Viroids erfolgt in erster Linie durch Berührungen der Pflanzen untereinander, nachgewiesen wurden aber auch Pollen- und Samenübertragung. Die Bekämpfung von PSTVd erfolgt durch Aussortieren kranker Knollen und Pflanzen sowie durch den Einsatz von Sorten, die eine erhöhte Resistenz gegen den Erreger aufweisen (Diener und Raymer, 1971; De Bokx und Piron, 1981).

Zu den wichtigsten pilzlichen Krankheitserregern der Kartoffel gehören *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Fusarium* spp., *Spongospora subterranea*, und *Synchytrium endobioticum*. Die durch *Phytophthora infestans* hervorgerufene Kraut- und Braunfäule ist eine der ältesten und verheerendsten Pilzkrankheiten der Kartoffel. Der Pilz kann sich unter entsprechenden Bedingungen sehr schnell vermehren und im Bestand ausbreiten. Infizierte Pflanzen bringt er zum vorzeitigen Absterben. Kommt es zu einem Befall der Knollen, so faulen diese im Boden oder nach der Ernte im Lager, was beides zu erheblichen Ertragseinbußen führt. Eine Luftfeuchtigkeit von über 80% und Temperaturen in Bereich von 8°C bis 21°C begünstigen den Pilz, es kommt dann vor allem bei feucht-warmen Wetter zur starken und schnellen Vermehrung der Sporen (Pittis und Shattock, 1994). Somit sind in regenreichen Sommern und bei anfälligen Sorten Ertragsminderungen von 30% keine Seltenheit.

Wegen der Rassenvielfalt des Pilzes ist die Resistenzzüchtung zur Bekämpfung von *Phytophthora infestans* wenig erfolgreich geblieben. Deswegen werden hauptsächlich vorbeugende Maßnahmen getroffen, um der Kraut- und Braunfäule entgegen zu wirken. Durch Vorkeimen des Saatguts beispielsweise wird das Wachstum in die befallsfreie Zeit vorverlegt, außerdem lassen sich bei der Vorkeimung infizierte Pflanzenknollen leicht erkennen und auslesen. Von ganz besonderer Bedeutung ist jedoch die Ausrottung von Primärherden. Frühzeitig im Bestand erkannte befallene Pflanzen können mittels Herbiziden abgetötet und entfernt werden, um der weiteren Verbreitung des Pilzes vorzubeugen (Harrison, 1992). Ist starker großflächiger Befall der Pflanzen bereits eingetreten, so hilft lediglich der Einsatz von Fungiziden, von denen inzwischen eine große Anzahl zur Verfügung steht. Dabei ist zu beachten, daß die Mittel in der Spritzfolge öfter gewechselt werden, damit sich keine resistenten Pilzstämme ausbilden können. In jüngster Zeit gab es auch Versuche, mittels Gentechnik resistente Kartoffelpflanzen zu erzeugen. Das Gen für Barnase, einer bakteriellen RNase, deren Expression in pflanzlichen Zellen zum Zelltod führt, wurde unter der Kontrolle eines durch *Phytophthora infestans* induzierbaren Promotors in Kartoffeln eingebracht. Der Pilz zeigte daraufhin eine erniedrigte Sporulationsrate auf transgenen Pflanzen, was durch kontrolliertes Absterben von infizierten Pflanzenteilen vermittelt wurde (Strittmatter et al., 1995). Weitere Erfolge mit transgenen Kartoffeln konnten durch die Expression einer Endoglucanase aus Soja (Borkowska et al., 1998), einer Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* (Wu et al., 1995) und durch die Einführung des Gens für Osmotin (Li et al., 1999) erzielt werden. Als weitere bedeutsame Kartoffelkrankheit ist die Wurzeltöterkrankheit zu nennen, die durch den Pilz *Rhizoctonia solani* hervorgerufen wird. Die Erreger kommen sowohl im Boden als auch in Form von Pocken auf ausgesäten Knollen vor, von wo aus sie ein Mycel bilden, das sich über die Knolle auf die jungen Triebe ausbreitet. Wachsen die Triebe bei naßkalter Witterung nur langsam, kann der Pilz diese bereits im Boden vernichten. Haben die Triebe die Bodenoberfläche erreicht, können Fußkrankheiten auftreten, wobei die Triebe an ihrer Basis braune abgestorbene Stellen zeigen, die zunächst zum Wipfelrollen führen und später die Stengel absterben lassen (Banville, 1989). Eine vorbeugende Bekämpfung der Krankheit ist über eine gute Bodenbearbeitung und beschleunigtes Auflaufen der Pflanzen durch die Aussaat von vorgekeimtem Pflanzgut möglich. Die weitgestellte Fruchtfolge verhindert zusätzlich die übermäßige Anhäufung der Erreger im Boden. Eine direkte

Bekämpfung des Pilzes kann über die chemische Behandlung der Pflanzknollen durch Beizung vor der Auspflanzung erfolgen (Jager et al., 1991). Kürzlich wurde ein gentechnischer Ansatz erprobt, bei dem das Endochitinasegen des fungiparasitären Pilzes *Trichoderma harzianum* in transgenen Kartoffeln exprimiert wurde. Das pilzliche Enzym wurde in verschiedenen Teilen der Pflanze nachgewiesen und hatte keinen sichtbaren Einfluß auf Wachstum und Entwicklung der Kartoffel. Einige ausgewählte Linien zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani* (Lorito et al., 1998). Die Dürrfleckenkrankheit, die durch den Pilz *Alternaria solani* hervorgerufen wird, ist eine weitere wichtige Krankheit der Kartoffel. Sie tritt meist ab Juni bis zur Ernte auf. Die Symptome zeigen sich zunächst auf den Blättern als braune oder schwarzbraune Flecken mit konzentrischen Ringen, die sich, wenn die Krankheit fortschreitet, vereinigen und zum Absterben des Blattes führen. Bei Knollen bewirkt der Pilz kleine, dunkle Verfärbungen auf der Schale, die später einschrumpfen. Im Gegensatz zu anderen Fäulen wird hierbei das befallene Gewebe hart (Holley et al., 1985). Die Kartoffelsorten sind unterschiedlich anfällig gegenüber der Dürrfleckenkrankheit (Pelletier und Fry, 1989), wodurch sich eine vorbeugende Bekämpfung durch die Wahl der Sorte anbietet. Eine chemische Bekämpfung des Erregers ist mit den für *Phytophthora infestans* üblichen Mitteln möglich (Shtienberg und Fry, 1990). Gentechnisch vermittelte Resistenzhöhung konnte durch den gleichen Ansatz wie gegen *Rhizoctonia solani* mit Hilfe des Endochitinasegens aus *Trichoderma harzianum* erreicht werden (Lorito et al., 1998).

Bakterien vermögen ebenfalls die Kartoffelpflanze und deren Knollen zu befallen. Zu den wichtigsten Erregern zählen *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* und *Streptomyces scabies*. *Clavibacter michiganensis* ist der Verursacher der Bakterienringfäule, die in Mitteleuropa lediglich geringe Schäden durch Fäulnis der Knollen verursacht. Der Erreger ist jedoch als Quarantäneorganismus eingestuft, weswegen auch latenter Befall zu vermeiden ist (Langerfeld, 1989). Die Symptome der Krankheit treten an der Kartoffelpflanze spät auf und sind schwer zu identifizieren. Erste Symptome zeigen sich zu Beginn der Blüte, wobei die Blätter eine schwache Gelbfärbung, ein Rollen nach oben hin sowie Vertrocknung vor der normalen Abreife aufweisen. An Stengeln und Knollenschalen sind keine auffälligen Veränderungen zu erkennen. Im Innern der Knollen zeigt sich jedoch der Gefäßbündelring vom Nabelende ausgehend zunächst glasig und später gelblich verfärbt (Zink, 1991). Bei starkem Befall enthält die ringförmige Zone eine weiche, faule Masse, die bei

geringem Druck von außen hervorquillt. Die Verwendung von gesundem Pflanzgut ist die wichtigste Maßnahme zur Verhütung der Krankheit. Außerdem haben sich hygienische Maßnahmen wie die Säuberung und Desinfektion von Lagerräumen und Maschinen bei starkem Auftreten der Ringfäule in den USA bewährt (Gudmestad, 1994). Auch die Braunfäule oder Schleimkrankheit, die durch das Bakterium *Ralstonia solanacearum* hervorgerufen wird, hat in Mittel- und Nordeuropa so gut wie keine Bedeutung, denn der Erreger ist hauptsächlich in wärmeren Gebieten verbreitet (Walker, 1992). Befallene Pflanzen zeigen als erste Anzeichen während der Mittagszeit reversible Welkeerscheinungen, beim Fortschreiten der Krankheit setzt sich die Welke bis zum Absterben der Pflanze fort. Stengel, Wurzel, Stolone und Knollen weisen braune Verfärbungen der Gefäßsysteme auf, aus denen ein grauweißer Bakterien Schleim austritt. Aus den Knollen tritt zur Erntezeit ebenfalls schleimiges Exsudat an den Keimanlagen aus (Lelliott und Stead, 1987). Nach der Ernte gehen befallene Knollen auch im Lager rasch in Fäulnis über. Zur Bekämpfung der Braunfäule werden vornehmlich phytosanitäre Maßnahmen ergriffen. Die späte Ernte der Knollen, um infiziertes Erntegut verlesen zu können, und der Anbau weniger anfälliger Sorten vermögen die Schäden in Grenzen zu halten. Aus *Solanum phureja*, einer Wildart aus Peru, die mittels hypersensitiver Reaktion gegen *Ralstonia solanacearum* resistent ist, konnte diese Eigenschaft in Kulturkartoffeln eingekreuzt werden. So eingeführte Merkmale gehen allerdings im Laufe des weiteren züchterischen Prozesses oft verloren (Pijnacker et al., 1989). Der Kartoffelschorf, der durch das Bakterium *Streptomyces scabies* verursacht wird, kommt in allen Regionen mit Kartoffelanbau vor, doch wird durch ihn in der Regel keine Ertragsminderung verursacht. Dagegen wirkt sich Kartoffelschorf qualitätsmindernd bei Speise- und Verarbeitungskartoffeln aus. Der Pflanzgutwert von Pflanzkartoffeln wird durch ihn nicht beeinträchtigt. Der Befall wirkt sich nicht auf das Blattwerk aus und ist erst bei der Ernte der Knollen festzustellen, wo sich die Krankheit durch unregelmäßig über die Knollenoberfläche verbreitete korkartige braune Flecken bemerkbar macht. Schorfige Knollen sind im Geschmack nicht beeinflusst, jedoch müssen höhere Schälverluste in Kauf genommen werden. Wegen dieser Qualitätsminderung ist schorfige Ware in den meisten Ländern Westeuropas nicht abzusetzen (Heitefuss et al., 1993). Da sich die Bakterien besonders gut bei pH-Werten über 6 und bei Trockenheit in den Monaten Juni und Juli entwickeln, erfolgt die Bekämpfung der Erreger durch den Einsatz von sauren Düngemitteln und Beregnung ab Beginn der Knollenentwicklung (Lapwood et al.,

1973). Von den bakteriellen Krankheitserregern kommt *Erwinia carotovora*, welches Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule bei der Kartoffel verursacht, die größte Bedeutung zu, weswegen dieses Bakterium und die mit ihm verbundenen Kartoffelkrankheiten im folgenden ausführlich behandelt wird.

1.2 Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule

Das phytopathogene Bakterium *Erwinia carotovora* verursacht bei der Kartoffelpflanze zum einen die Schwarzbeinigkeit, „black leg“, und zum anderen bei der Knolle die Knollennaßfäule, „soft rot“. Während der Vegetation können die Schäden im Bestand durch Schwarzbeinigkeit 30% und mehr betragen. Unter ungünstigen Lagerbedingungen kann es durch die schnelle Ausbreitung der Knollennaßfäule zu Totalverlusten innerhalb eines Lagerbestands kommen. Im langjährigen Mittel kann von einer Verlustquote von 5 bis 8% ausgegangen werden. Der Wert weltweiter Verluste durch diese Krankheit wird auf 50 bis 100 Mill. US\$ geschätzt (Pérombelon und Kelman, 1980). Aus diesem Grund gilt *Erwinia carotovora* als einer der bedeutendsten Krankheitserreger der Kartoffel.

Von Schwarzbeinigkeit befallene Pflanzen weisen während des Auflaufens und der Entwicklung bis zur Blüte an Einzeltrieben oder allen Sprossen Vergilbungen und Wuchsdepressionen zunehmenden Grades auf. Die Fiederblätter sind nach oben eingerollt und abwärts gerichtet, bei starker Sonneneinstrahlung tritt vorübergehend Welke ein, am unteren Stengel oder an den Blattachsen werden vereinzelt Luftknollen gebildet. Mit zunehmender Krankheitsentwicklung treten an den Trieben Absterbe- und Dürreerscheinungen auf. Die Pflanzen lassen sich leicht aus dem Boden ziehen und zeigen an der Stengelbasis eine typische Schwarzfärbung mit starker Gewebeerstörung. Im Sproßteil ist das Gefäßsystem in weiten Bereichen verbräunt. Die Wurzeln sind meist völlig abgestorben. Bei akutem Krankheitsverlauf bleibt die Knollenbildung aus. Frühzeitiger Krankheitseinbruch kann zu erheblichen Fehlstellen im Bestand beitragen. Mit zunehmendem Pflanzenalter wird die Symptomausprägung an den Sprossen schwächer, weiterentwickelte Pflanzen zeigen Fäulniserscheinungen an Stolonen und jungen Knollen, die bis zur Ernte völlig zerstört sein können. Entscheidend für die Infektion der Pflanze ist die Übertragung der Erreger durch befallene, angefaulte Knollen bzw. durch latent verseuchtes oder äußerlich kontaminiertes Pflanzgut (Molina und Harrison, 1977). Die Bakterien können sich im Lager vom Herbst bis zum Frühjahr auf der Knollenoberfläche, in

den Lentizellen und im Periderm halten (Pérombelon, 1973). Nach der Pflanzung werden die Sprosse während des Austreibens von der Knolle infiziert. Nur bei der durch die Subspezies *carotovora* verursachte Luftstammfäule kann die Infektion auch über verwundetes Gewebe erfolgen. In diesem Fall werden die Erreger über den Boden, Bewässerung oder Insekten übertragen (Cappaert et al., 1988; Perrson, 1988; Powelson und Apple, 1984).

Die Knollennaßfäule beginnt im Boden meist am Nabelende, bei feuchtkaltem Wetter verstärkt an den Lentizellen. Das Knollenfleisch ist dann lokal wasserdurchtränkt, entfärbt und geht in eine weißliche bis rosa getönte, breiige Masse über, die nur durch die Schale zusammengehalten wird. Der Faulbrei verfärbt sich an der Luft rötlich bis dunkelbraun und nimmt einen stechenden Geruch an. Schwach erkrankte oder bei der Ernte kontaminierte Knollen zersetzen sich im Lager. Der Faulbrei geht dort auf benachbarte Knollen über, und es entstehen um sich greifende Fäulnisherde, was bis zum gesamten Verlust der Ernte führen kann. Während längerer Transporte kann eine Kartoffelpartie ebenfalls hohe Einbußen erleiden. Auf die Verluste durch Knollennaßfäule bei eingelagerten Knollen haben die Lagerbedingungen großen Einfluß, insbesondere Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt der Luft (Pérombelon und Kelman, 1980; Pérombelon und Lowe, 1975). Unter optimalen Lagerbedingungen, das sind niedrige Temperatur, niedrige Luftfeuchtigkeit und gute Durchlüftung, bleiben die Bakterien in der Regel passiv. Hohe relative Luftfeuchte ermöglicht jedoch das Eindringen der Pathogene durch die geöffneten Lentizellen, mit steigender Temperatur nimmt der Befall zu, hohe Fäulnisraten treten bei höherem CO₂- und vermindertem Sauerstoffgehalt auf (Ramsey et al., 1944; Lipton, 1967; Scholey et al., 1968; Nielsen, 1968; Workman und Twomey, 1970; Lund und Wyatt, 1972). Somit sind besonders Knollen, die sich in schlecht durchlüfteten Lagern befinden, sowie untere Schichten im Lagerbestand stärker gefährdet. Da verletzte und faulende Knollen eine erhöhte Atmungsintensität aufweisen (Nielsen, 1968), also vermehrt Sauerstoff verbrauchen und CO₂ bilden, verstärkt sich der Fäulniseffekt, was zu einer schnellen Ausbreitung der Krankheit führt.

Erwinia-Bakterien dringen über die Lentizellen oder Wunden in die Knolle ein, wo sie dann zunächst in geringer Anzahl präsent sind. Dort erfolgt die Ausbreitung und Vermehrung der Erreger in den interzellulären Räumen des Speicherparenchyms. Mit Hilfe eines Meßsystems, das es den Bakterien erlaubt, ihre eigene Zelldichte zu ermitteln, wird die Expression der Virulenzfaktoren so lange reprimiert, bis eine bestimmte Zelldichte erreicht ist. Erst dann

erfolgt der eigentliche Angriff durch Synthese und Sekretion zellwandzersetzender Enzyme (Pirhonen et al., 1993; Wharam et al., 1995), was zur Zerstörung des pflanzlichen Gewebes führt. Die Virulenz von *Erwinia* ist bedingt durch deren Fähigkeit, ein breites Spektrum an Enzymen zu sekretieren, um pflanzliche Zellwände abzubauen. Dazu gehören Pektinasen, Cellulasen und Proteasen, die das pflanzliche Gewebe mazerieren und somit Nährstoffe zum bakteriellen Wachstum freisetzen (Collmer und Keen, 1986; Kotoujansky, 1987; Pirhonen et al., 1991). Diese Enzyme, insbesondere Pektinasen, scheinen eine ambivalente Rolle bei der Interaktion des Bakteriums mit der Pflanze zu spielen. Zum einen stellen sie die hauptsächlichen Virulenzfaktoren dar, indem sie die Zellwände der Pflanzen angreifen und zerstören, zum anderen wird durch sie die Pathogenabwehr in Pflanzen induziert (Davis et al., 1984; Palva et al., 1993; Vidal et al., 1997; 1998).

Die pflanzliche Zellwand setzt sich aus einer mikrofibrillären und einer Matrixphase zusammen. Erstere besteht aus Cellulose, die zweite aus einer Reihe von Polysacchariden, Proteinen und phenolischen Komponenten. Die Matrixphase ist sehr komplex und variiert je nach Pflanzenart, Zelltyp, Alter der Pflanze und äußeren Bedingungen (Hoson, 1991). In höheren Pflanzen ist die Zellwand vierschichtig. Die Mittellamelle ist aus Pektinen mit Kalzium- und Magnesiumionen zusammengesetzt. Sie besitzt Gelcharakter mit einer nur geringen Ausdehnung und sorgt im Gewebeverband für den Zusammenhalt der Zellen untereinander (Varner und Lin, 1989). Daran angelagert befindet sich die Primärwand, deren Grundstruktur aus Pektinen, Hemicellulose und Cellulose besteht, gefolgt von Sekundär- und Tertiärwand. Um pflanzliche Zellwände abzubauen, produziert und sekretiert *Erwinia* eine Reihe von Enzymen, zu denen neben pektolytischen Enzymen wie Polygalakturonase, Pektinlyase, Pektatlyase und Pektinmethylesterase auch Cellulasen, Proteasen und Xylanasen gehören (Collmer und Keen, 1986; Kotoujansky, 1987). Die Pektinmethylesterase demethyliert Pektin unter Freisetzung von Polypektat, PGA, und Methanol (Laurent et al., 1993). PGA wird daraufhin einerseits durch Pektatlyase in einer transeliminativen Reaktion zu ungesättigten Oligogalakturoniden abgebaut (Collmer und Keen, 1986) und andererseits von Polygalakturonase durch Hydrolyse in gesättigte Oligogalakturonide gespalten (He und Collmer, 1990). Für beide pektolytische Enzyme stellt PGA das bevorzugte Substrat dar, doch kann auch Pektin in gewissem Umfang je nach Methyl-Veresterungsgrad verwertet werden (Heikinheimo et al., 1995). Cellulase ist eine β -1,4-Endoglucanase und setzt Cellulose

in Cellobiose um (Barras et al., 1992). Während aufgereinigte Pektatlyasen und Polygalakturonasen lebendes Gewebe ohne Hilfe mazerieren, sind Pektinmethylesterase und Cellulase dazu nicht in der Lage.

Im Gegensatz zu tierischen Schädlingen und pilzlichen Krankheitserregern existiert für bakterielle Pathogene der Kartoffel kein wirksamer chemischer Pflanzenschutz. Viren kann zwar auch nicht direkt entgegen gewirkt werden, doch durch die Bekämpfung ihrer Vektoren mit Insektiziden kann man deren Ausbreitung einschränken. Somit verbleiben vorbeugende, meist hygienische Maßnahmen sowie die Wahl resistenterer Sorten zur Verhinderung von bakteriellen Krankheiten. Unter den bakteriellen Erregern richtet *Erwinia carotovora* bei der Kartoffel die größten Schäden an. Der Bekämpfung der Bakterien in der Knolle kommt eine doppelte Bedeutung zu. Zum einen kann dadurch die Knollennaßfäule direkt unterbunden und zum anderen Schwarzbeinigkeit, die an Trieben aus verseuchtem Pflanzgut auftritt, verhindert werden. Beim Vorgehen gegen das Bakterium ist der Tatsache, daß die Ausbreitung der Knollennaßfäule vornehmlich unter anaeroben Bedingungen erfolgt, besonderes Augenmerk zu widmen. Konventionelle Züchtungsversuche haben bislang nicht zu Sorten geführt, die Resistenz gegen *Erwinia* zeigten. Zudem lassen sich Kartoffeln durch Züchtung nur schwer verändern, was daran liegt, daß sie tetraploid, hoch heterozygot und genetisch äußerst komplex sind (Sinden et al., 1993). In so einem Fall bietet die Gentechnik eine Möglichkeit, das Problem mit neuen Strategien zu lösen. Die Expression antibakterieller Fremdproteine kann einen Resistenzmechanismus darstellen und als Unterstützung der natürlichen Pathogenabwehr der Pflanzen dienen.

1.3 Die Pathogenabwehr der Pflanze

Alle Veränderungen der Umweltbedingungen führen in Pflanzen zu Modifikationen der Genexpression, wodurch sie in die Lage versetzt werden, auf die neuen Bedingungen zu reagieren und sich ihnen anzupassen. Bei der Pflanze kann bezüglich der Pathogenabwehr zwischen zwei Antworten unterschieden werden. Die eine besteht in der schnellen lokalen Genaktivierung, die zur hypersensitiven Reaktion, zum programmierten Zelltod und zur Dezimierung oder Wachstumshemmung der angreifenden Pathogene führt. Die andere, systemisch akquirierte Resistenz (SAR), besteht in der systemischen Expression von Genen,

die in Verbindung mit der nicht lokal begrenzten pflanzlichen Pathogenantwort stehen. Bei SAR wird die Synthese von PR (pathogenesis related) Proteinen in der gesamten Pflanze induziert, was zu einem effektiven Schutz gegen ein großes Spektrum an Pathogenen über einen längeren Zeitraum führen kann (Hahlbrock und Scheel, 1987; Bol et al., 1990). Die Pathogenabwehr wird durch Elicitoren induziert, die entweder direkt durch das Pathogen produziert und freigesetzt werden, oder im Fall von endogenen Elicitoren durch Einwirkung der Pathogene auf die pflanzliche Zellwand und deren Abbau entstehen (Collinge und Slusarenko, 1987; Davis und Hahlbrock, 1987; Farmer et al., 1991). Zu den lokalen und schnellen pflanzlichen Reaktionen auf Pathogenbefall zählt die Verstärkung der Zellwand, um das weitere Eindringen der Pathogene zu erschweren (Dixon et al., 1994), die Einlagerung von Kallose (Bonhoff et al., 1987), die Lignifizierung der Zellwand (Vance et al., 1980), die Einlagerung phenolischer Komponenten (Hunter, 1974) sowie die Akkumulation hydroxyprolinreicher Glycoproteine (Mazau und Esquerré-Tugayé, 1986). Zu den PR-Proteinen, die bei Pathogenbefall systemisch induziert werden, gehören Chitinasen, β -1,3-Glucanasen und Lysozyme (Boller, 1987), welche in der Lage sind, die Zellwandpolymere der Pathogene anzugreifen. Daneben werden Inhibitoren mikrobieller Enzyme (Bishop et al., 1981) und Lektine (Sequeira, 1978) zur Agglutination von Zellen synthetisiert. Eine weitere biochemische Veränderung unter Pathogeneinwirkung stellt die Biosynthese und Akkumulation von Phytoalexinen dar, bei welchen es sich um sekundäre Metabolite handelt, die auf Bakterien und Pilze toxisch wirken (Darvill und Albersheim, 1984). Bei der Antwort von Pflanzen auf *Erwinia*-Befall findet lediglich die systemische Pathogenantwort der Pflanze statt, hypersensitive Reaktionen und induzierter Zelltod werden nicht ausgelöst (Klement, 1982). Außerdem scheint *Erwinia* über einen noch unbekannten Mechanismus in der Lage zu sein, die Abwehrreaktion der Kartoffel teilweise zu unterdrücken.

1.4 Gentechnische Resistenzstrategien

Da die natürlichen Schutzmechanismen der Pflanze oft nicht ausreichen, um bakterielles Wachstum zu inhibieren, und da durch klassische Züchtung bisher keine effektive Resistenz in die Kartoffel eingekreuzt werden konnte, bietet sich mit der Gentechnik eine neue Möglichkeit, Pflanzen mit Resistenz gegen *Erwinia* herzustellen. Bei Pflanzen sind bislang einige vielversprechende gentechnische Ansätze erprobt worden, um Resistenz gegen bakterielle

Erreger zu erzeugen. Dabei werden Fremdproteine in Pflanzen exprimiert, die neue Resistenzen vermitteln oder die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze stimulieren oder beides bewirken.

Hierzu zählt die Expression von Cecropin in Tabak und Kartoffel. Bei den Cecropinen handelt es sich um bakterizide Peptide, die von *Hyalophora cecropia* synthetisiert werden, und sowohl mit der äußeren bakteriellen als auch mit Membranen eukaryontischer Zellen interagieren, wobei der Effekt auf Bakterien stärker ist als der auf Wirtspflanzenzellen (Boman, 1991; Gudmundsson et al., 1991). Mit einer modifizierten und aktiveren Variante des Cecropins konnte in Tabak eine erhöhte Resistenz gegen *Pseudomonas solanacearum* (inzwischen umbenannt in *Ralstonia solanacearum*) festgestellt werden (Jaynes et al., 1993). Dagegen wurden von anderen Gruppen weder detektierbare Mengen Cecropin noch signifikante Resistenzen bei Kartoffel und Tabak festgestellt (Allefs et al., 1995; Florack et al., 1995), was mit der geringen Stabilität von Cecropin in Pflanzen erklärt wurde.

Die Expression einer Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* und ihre effektive Sekretion in den Interzellularraum von Kartoffelpflanzen führte zur Umsetzung von β -D-Glukose in Glukonat und Wasserstoffperoxid, was in Laborversuchen zu einer erhöhten Resistenz von Knollenscheiben gegen *Erwinia carotovora* und Blättern gegen *Phytophthora infestans* führte (Wu et al., 1995). Bei diesem Ansatz spielt neben der direkten Wirkung des Wasserstoffperoxids sicherlich auch die Stimulierung der kartoffeleigenen Abwehr eine wesentliche Rolle. Die Bildung von aktivem Sauerstoff erfolgt bei vielen Ereignissen im Verlauf der pflanzlichen Pathogenabwehr, z.B. bei induzierter Resistenz, hypersensitivem Zelltod, Modifikationen der Zellwand, Signaltransduktion u.a. (Baker und Orlandi, 1995). Diese und die direkte Wirkung auf Pathogene wurde bei dem von Wu et al. (1995) beschriebenen gentechnischen Ansatz genutzt.

Ein weiterer wesentlicher Schritt bei der Resistenz gegen Bakterien wurde durch die Expression von Lysozymen in Pflanzen gemacht. Lysozyme stellen eine sehr verbreitete Familie bakteriolytischer Enzyme dar, die in vielen Spezies, u.a. auch Pflanzen, gefunden werden. Ihre Wirkung beruht auf der Muramidaseaktivität, wodurch die bakterielle Mureinzellwand angegriffen wird und die Bakterien lysiert werden. Pflanzenlysozyme zeigen in der Regel neben ihrer Muramidaseaktivität eine im Vergleich höhere Chitinasefunktion (Cutt und Klessig, 1992; Majeau et al., 1990; Trudel et al., 1989). Da sich die pflanzeneigenen

Lysozyme meist in der Vakuole befinden, kann ihre Freisetzung erst nach der Zerstörung der Zelle erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Anzahl der angreifenden Zellen jedoch schon so groß, daß die bakteriolytische Aktivität vermutlich nicht mehr ausreicht, um Resistenz zu vermitteln (Düring, 1996). Ausführlich untersucht wurden das Lysozym des Bakteriophagen T4 und Hühnereiweiß-Lysozym, wobei beide Enzyme hohe bakteriolytische Aktivität zeigten. T4-Lysozym ist jedoch gegen ein breiteres Spektrum gram-positiver und gram-negativer Bakterien wirksam und somit potenter als Hühnereiweiß-Lysozym (Düring, 1994). T4-Lysozym wurde in Kartoffel exprimiert und führte zu einer erhöhten Resistenz der Pflanzen gegen *Erwinia carotovora* (Düring et al., 1993). Dabei wurde die DNA-Sequenz des Signalpeptids des Gens der α -Amylase aus Gerste mit dem Gen für T4-Lysozym fusioniert, um das Enzym in den Interzellularraum zu sekretieren. Jüngst wurde eine bislang nicht bekannte und hoch interessante Eigenschaft von T4-Lysozym aufgedeckt. Neben der seit langem bekannten und ausführlich beschriebenen Muramidaseaktivität verfügt das Enzym auch über eine bakterizide Wirkung. Die Muramidaseaktivität geht zwar nach Hitzeinaktivierung verloren, die bakterizide Wirkung bleibt jedoch erhalten. Dies wird auf amphipatische Helixstrukturen am C-Terminus des Enzyms zurückgeführt, die vermutlich mit Zellmembranen interagieren und diese schädigen. Ein synthetisch hergestelltes Peptid, das dem C-terminalen Ende von T4-Lysozym entspricht, zeigt ebenfalls bakterizide Eigenschaften. Ferner wurde festgestellt, daß sich die Wirkung von T4-Lysozym und der davon abgeleiteten Peptide auch auf Pilze erstreckt (Düring et al., 1999). Damit ist das Wirkspektrum des Enzyms nicht nur auf bakterielle Pathogene beschränkt. Mit T4-Lysozym ist ein breitbandiger Resistenzansatz gegen phytopathogene Pilze und Bakterien denkbar. Dieses und die bisherigen guten Ergebnisse mit Kartoffel, wo durch die T4-Lysozym-Expression und die Sekretion in den Interzellularraum eine erhöhte Resistenz gegen *Erwinia carotovora* erzielt wurde, qualifizieren diesen Resistenzansatz für weitere Studien.

Weitere gentechnische Ansätze beim Kampf gegen bakterielle Pathogene sind die Expression von Attacin E im Apfel (Norelli et al., 1994), Thioninen aus Weizen und Gerste in transgenen Tabakpflanzen, Kartoffeln und Tomaten (Carmona et al., 1993; Florack et al., 1994), Tachyplesin I in transgener Kartoffel (Allefs et al., 1996), Oligogalakturonidlyase aus *Erwinia carotovora* in transgener Kartoffel (Weber et al., 1994), gegen Bakterientoxine wirkenden bakteriellen Genen (Anzai et al., 1989; de la Fuente-Martinez et al., 1992) und monoklonalen

Antikörpern oder daraus abgeleiteten Fragmenten, die Pathogenitätsfaktoren von *Erwinia* inhibieren (Winkler, 1998).

Bakterielle Pathogene befallen Pflanzen über Gewebsverletzungen oder natürliche Öffnungen wie die Lentizellen der Kartoffelknolle. Sie sind zunächst nur in geringer Anzahl präsent, bis sie sich im Interzellularraum vermehren. Deshalb ist bei gentechnischen Resistenzstrategien zu beachten, daß die Lokalisierung der antimikrobiellen Proteine im Interzellularraum erfolgt, damit die Bakterien noch vor ihrer Vermehrung bekämpft werden, was durch die Verwendung von Signalpeptiden erreicht werden kann.

1.5 Anaerob induzierbare Promotoren

Bakterielle Kartoffelknollenfäulen, insbesondere die von *Erwinia carotovora* verursachte Knollennaßfäule, treten verstärkt bei unsachgemäßer Knollenlagerung auf (Cromarty und Easton, 1973; Kelman et al., 1978). Zu den ungünstigen Lagerbedingungen zählen hohe Temperaturen, hohe Luftfeuchtigkeit und schlechte Durchlüftung, welche zu einem erhöhten Kohlendioxid- und verminderten Sauerstoffgehalt der Luft führt. Es hat sich gezeigt, daß die Knollen unter anaeroben Bedingungen besonders anfällig sind (De Boer und Kelman, 1978; Lund und Nicholls, 1970; Lund und Wyatt, 1972; Pérombelon und Lowe, 1975), was dadurch zu erklären ist, daß die pflanzlichen Abwehrmechanismen gegen Pathogene bei Sauerstoffarmut weniger effektiv sind (Lipton, 1967; Wigginton, 1974). Außerdem kann die bakterielle Sauerstoffzehrung und der die Knolle überziehende Bakterien Schleim bei einer Infektion zu Sauerstoffarmut in der Knolle führen, denn es wurde festgestellt, daß die O₂-Konzentration innerhalb von Knollen, deren Oberfläche mit einem kontinuierlichen Wasserfilm überzogen ist, verringert ist (Burton und Wigginton, 1970). Eine gentechnische Resistenzstrategie gegen *Erwinia* wäre aus diesen Gründen besonders effektiv, wenn das antimikrobielle Protein unter anaeroben Bedingungen exprimiert würde. Bei den vorstehend beschriebenen Resistenzansätzen wird die Expression der gegen die Pathogene gerichteten Gene in der Regel nicht gesteuert; vielfach wird der als in Pflanzen stark und konstitutiv geltende 35S Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus verwendet. Transiente Genexpressionsexperimente beim Mais zeigten jedoch, daß dieser Promotor im Mais unter anaeroben Bedingungen nicht aktiv ist (U. Köhler, pers. Mitteilung). Im Zuge dieser Arbeit war zu überprüfen, ob der 35S Promotor in der Kartoffel unter anaeroben Bedingungen ebenfalls inaktiv ist. Falls dies zuträfe, bedeutet

das aber nicht, daß Resistenzstrategien gegen Knollenfäulen beim Einsatz des 35S Promotors nicht effektiv sind. Zum einen werden dadurch die pflanzeigenen Abwehrmechanismen unter Normalbedingungen ergänzt, ferner wird unter aeroben Bedingungen antibakterielles Protein akkumuliert, welches nach dem Übergang zur Anaerobiose zumindest für einen begrenzten Zeitraum zur Verfügung steht.

Wenn man davon ausgeht, daß die pflanzeigene Pathogenabwehr unter optimalen Lagerbedingungen ausreicht, um die Entstehung der Knollenfäule zu unterbinden, besteht keine Notwendigkeit für eine konstitutive, unter aeroben und anaeroben Bedingungen aktive Expression des antimikrobiellen Fremdgens. Vielmehr wäre es für die Ökonomie der Pflanze vorteilhaft, wenn die Expression ausschließlich bei Anaerobiose oder Pathogenbefall, also nur bei Bedarf, erfolgen würde. Außerdem könnte eine geregelte und nicht ständig aktive Genexpression Resistenzbrechungsversuchen der Pathogene vorbeugen. Deshalb sollte die antimikrobielle Fremdproteinsynthese unter der Kontrolle eines unter aeroben Bedingungen nicht aktiven und durch Anaerobiose induzierbaren Promotors erfolgen.

Anaerob induzierbare Promotoren steuern anaerob induzierte Gene, von denen bei Pflanzen einige bekannt sind. Bislang wurde jedoch das Induktionsverhalten von lediglich vier anaeroben Promotoren durch Fusion mit Reportergenen transient oder transgen in Pflanzen untersucht. Dabei handelt es sich um den *Adh1* Promotor aus Mais in transgenem Tabak (Ellis et al., 1987) und Reis (Kyojuka et al., 1991), den *Arabidopsis GapC* Promotor in Tabak (Yang et al., 1993), den *Arabidopsis Adh* Promotor in transgenen Arabidopsispflanzen (Dolferus et al., 1994) und transient in *Arabidopsis*, *Nicotiana plumbaginifolia* und *Pisum sativum* (Hoeren et al., 1998) sowie den Mais *GapC4* Promotor in Mais (Köhler et al., 1995; Manjunath und Sachs, 1997; Bailey-Serres und Dawe, 1996) und transgenem Tabak (Köhler et al., 1996). In Kartoffel wurde die anaerobe Induzierbarkeit dieser Promotoren bisher nicht getestet. Der *Adh1* Promotor aus Mais wurde mit Hilfe von Reportergenen untersucht und ist in transgenen Reiswurzeln und Keimlingen 81-fach anaerob induzierbar. Im Tabak zeigte der unveränderte Promotor zunächst keine anaeroben Signale, erst nach Fusion des Promotors mit dem Octopinsynthese-Enhancer wurde eine 10- bis 20-fache Induktion festgestellt. Etwa zweifache Fluoreszenz zeigte sich nach anaerober Inkubation von transgenem Tabak, der mit dem GUS-Gen unter der Kontrolle des *GapC* Promotors aus *Arabidopsis* transformiert worden war. Der *Adh* Promotor aus *Arabidopsis* wurde mit dem GUS-Gen fusioniert und in *Arabidopsis* nach

Retransformation getestet, wobei bis zu 50-fache Induktion beobachtet wurde. Ebenfalls durch Fusion mit dem GUS-Gen wurde der Mais *GapC4* Promotor untersucht. In Mais wird der Promotor etwa dreifach durch Anaerobiose induziert, in transgenem Tabak wurde für diesen Promotor in sechs Linien mehr als 1000-fache, in einer Linie über 5000-fache anaerobe Induktion gemessen. Diese hohen Induktionsfaktoren beruhen nicht nur auf der hohen Expression unter anaeroben Bedingungen, sondern sind auch auf die niedrigen aeroben Aktivitäten zurückzuführen. Aufgrund seiner starken anaeroben Induzierbarkeit in Tabak scheint mit dem *GapC4* Promotor ein geeigneter Promotor vorzuliegen, um mit dessen Hilfe effiziente anaerob induzierte antimikrobielle Fremdgenexpression zur Erhöhung der Kartoffelresistenz gegen *Erwinia carotovora* zu erreichen.

Der Mais *GapC4* Promotor steuert in Mais die Transkription der mRNA der cytosolischen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 4, kurz *GapC4*. *GapC4* wurde als viertes Mitglied einer Genfamilie entdeckt (Kersanach et al., 1994), der noch *GapC1*, *GapC2* und *GapC3* angehören. Die *GapCs* verhalten sich unter Anaerobiose unterschiedlich. Während *GapC1* und *GapC2* anaerob reprimiert sind, werden *GapC3* und *GapC4* unter anaeroben Bedingungen induziert (Russell und Sachs, 1989; Martinez et al., 1989; Russell und Sachs, 1992). Damit gehört *GapC4* zusammen mit anderen Maisenzymen zu einer Gruppe, die anaerob induziert werden. Pflanzen zeigen bei unzureichender Versorgung mit Sauerstoff eine schnelle Reaktion, die zur Einstellung der Expression der meisten Gene führt (Kennedy et al., 1992; Perata und Alpi, 1993). Stattdessen wird in Mais die Biosynthese von etwa 20 anaerob induzierten Proteinen verstärkt (Sachs et al., 1980). Zu ihnen zählen Alkoholdehydrogenase (Sachs et al., 1980), Laktatdehydrogenase (Good und Paetkau, 1992), Sucrosesynthase (Springer et al., 1986), Aldolase (Kelley und Freeling, 1984a; Dennis et al., 1988), Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Kelley und Freeling, 1984b), Pyruvatdecarboxylase (Laszlo und St. Lawrence, 1983), Phosphoglyceratmutase (Bailey-Serres et al., 1988) sowie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 3 und 4. Auffällig ist, daß alle diese anaerob induzierten Proteine Enzyme der glykolytischen und fermentativen Stoffwechselwege sind. Die Atmungskettenphosphorylierung kann in Abwesenheit von Sauerstoff zur Energiegewinnung nicht genutzt werden, Energie wird nur noch durch die ATP-produzierenden Schritte der Glykolyse erzeugt, zur Regeneration von dabei entstandenem NADH werden die

überschüssigen Reduktionsäquivalente bei der Gärung auf andere Elektronenakzeptoren übertragen.

Neben seiner vielfach stärkeren anaeroben Induzierbarkeit zeigt der Mais *GapC4* Promotor im Vergleich mit den *Adh* Promotoren aus Mais und *Arabidopsis* sowie dem *Arabidopsis GapC* Promotor weitere herausragende Eigenschaften in Tabak (Köhler et al., 1996): Er ist unter aeroben Bedingungen nicht aktiv, es liegt keine Gewebespezifität vor, die anaerobe Induktion erfolgt in der gesamten Pflanze, und er wird spezifisch durch Anaerobiose induziert. Abgesehen von schwacher Induktion durch UV-Licht und Verwundung erfolgt starke Induktion nur unter anaeroben Bedingungen. Damit eignet sich der *GapC4* Promotor für biotechnologische Anwendungen in Tabak, die auf spezifischer und starker anaerober Genexpression aufbauen. Wegen der Verwandtschaft des Tabaks mit der Kartoffel ist zu vermuten, daß sich der Promotor in der Kartoffel ähnlich verhält.

1.6 Zielsetzung

Ein Resistenzansatz gegen bakterielle Pathogene der Kartoffel ist zu entwickeln, wobei die Strategie besonders gegen die von *Erwinia carotovora* verursachte Knollennaßfäule ausgerichtet ist. Da sich bislang keine natürlichen Resistenzen in die Kartoffel einkreuzen ließen und auch kein wirksamer chemischer Pflanzenschutz existiert, haben sich bisher lediglich solche Resistenzstrategien als erfolgreich erwiesen, bei denen die Pflanzen mittels Gentechnik mit einem zusätzlichen antimikrobiellen Gen ausgestattet wurden. Zur Kontrolle eines gegen *Erwinia carotovora* gerichteten Gens soll ein anaerob induzierbarer Promotor verwendet werden, um den antimikrobiellen Faktor gezielt unter den für die Krankheitsentwicklung günstigen sauerstoffarmen Bedingungen zu exprimieren.

Untersuchungen an transgenem Tabak hatten ergeben, daß der *GapC4* Promotor aus Mais unter anaeroben Bedingungen in allen Geweben stark induzierbar ist, während er unter aeroben Bedingungen nicht aktiv ist. Das Verhalten dieses Promotors in der Kartoffel soll untersucht werden. Dabei ist zu klären, ob der *GapC4* Promotor auch in der Kartoffel, insbesondere in der Knolle, durch Anaerobiose induzierbar ist. Ferner wird angenommen, daß der *Erwinia*-Befall in der Knolle ein anaerobes Milieu erzeugt, und somit ist herauszufinden, ob in aerob gelagerten Knollen, die mit *Erwinia carotovora* infiziert sind, Promotoraktivierung erfolgt. Zur Analyse des Induktionsverhaltens werden transgene Kartoffeln hergestellt, die das Gen für β -

Glucuronidase (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1987), ein Reportergen, unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen. Blätter, Stengel, Wurzeln und Knollen der erhaltenen Regeneranten sind unter anaeroben Bedingungen auf Promotorinduktion hin zu analysieren. Ferner wird das Induktionsverhalten des Promotors in Knollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora* untersucht.

Der Resistenzansatz gegen Knollennaßfäule, bei dem T4-Lysozym in den Interzellularraum sekretiert wurde, hat gute Ergebnisse gezeigt. Diese Strategie wird durch die Verwendung des *GapC4* Promotors weiterentwickelt. Es werden transgene Kartoffeln hergestellt, die das Lysozymgen mit einer Signalpeptid-DNA Sequenz unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen. Anschließende Resistenztests mit transgenen Knollen werden zeigen, ob dadurch die Anfälligkeit der Knollen gegenüber *Erwinia carotovora* reduziert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Bio Rad, Carl Roth, Duchefa, Merck, Serva und Sigma bezogen.

Es wurden Enzyme der folgenden Hersteller verwendet: Boehringer Mannheim, Fermentas, New England Biolabs.

2.2 Verwendete Konstrukte

Um das Verhalten des *GapC4* Promotors in der Kartoffel zu studieren, wurden folgende Konstrukte verwendet: 35S-GUS in pOCA28, *GapC4*-GUS in pOCA28, promotorlos-GUS in pOCA28 und pOCA28. Für die Resistenztests wurden zwei Konstrukte hergestellt, welche das Lysozymgen des Bakteriophagen T4 mit vorgeschalteter DNA-Sequenz des α -Amylasesignalpeptids aus Gerste unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen.

Zur Herstellung rekombinanter DNA wurden Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989) eingesetzt. Zur Plasmidisolierung aus Bakterien und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden Kits (Qiagen) verwendet.

2.2.1 35S-GUS in pOCA28

Das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des 35S Promotors aus dem Blumenkohl-mosaikvirus (Odell et al., 1985) diente als Positivkontrolle und Referenz bei den GUS-Tests. Zur Konstruktion wurde das Plasmid pCMVGUS3 (R. Hehl, unveröffentlicht) mit PvuII geschnitten. Das 35S-GUS Fragment wurde isoliert und in die SmaI Schnittstelle des binären Vektors pOCA28 (Honma et al., 1993; Olszewski et al., 1988) kloniert. Das resultierende Plasmid pSR5-2 wurde mittels Elektroporation (siehe 2.3) in *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA 101 (Hood et al., 1993) überführt. Die mit diesem Konstrukt transformierten Kartoffellinien tragen die Bezeichnung 1-x.

2.2.2 *GapC4*-GUS in pOCA28

Dieses Konstrukt trägt das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des Mais *GapC4* Promotors. Mit dessen Hilfe soll das Induktionsverhalten des Promotors in transgenen Kartoffeln studiert werden. Die Klonierung wurde von Köhler et al. (1996) in pOCA28

durchgeführt. Der resultierende Vektor wurde ebenfalls in *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 transferiert. Transgene Kartoffellinien, die damit transformiert wurden, werden mit 2-x bezeichnet.

2.2.3 promotorlos-GUS in pOCA28

Das Gen der β -Glucuronidase ohne Promotor stellt eine Negativkontrolle dar, mit der mögliche Einflüsse der T-DNA auf die Reportergenexpression erkannt werden können. Klonierung und Überführung des Vektors in pOCA28 und *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 wurde ebenfalls von Köhler et al. (1996) durchgeführt. Die mit diesem Konstrukt transformierten Kartoffellinien tragen die Bezeichnung 3-x.

2.2.4 pOCA28

Hierbei handelt es sich um die transgene Kontrolle, die außer dem pflanzlichen Selektionsmarker kein Gen trägt. Der Vektor wurde von Köhler et al. (1996) in *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 transformiert. Die aus der Transformation mit diesem Konstrukt hervorgehenden transgenen Pflanzen werden mit 4-x bezeichnet.

2.2.5 *GapC4-lys* in pSR8-39

Zur Isolierung des *GapC4* Promotorfragments wurde das Plasmid pUK440 (Köhler et al., 1995) verwendet. Ein 785 bp großes Fragment wurde mittels Restriktionsverdau mit MfeI und XhoI herausgeschnitten. Die 5'-überstehenden Enden dieses Fragments wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Das Promotorfragment wurde in die Asp718-Schnittstelle des Vektors pSR8-33 (A. Jahnke und K. Düring, unveröffentlicht) kloniert. Dieser enthält das Gen für T4-Lysozym hinter der DNA-Sequenz des α -Amylase-Signalpeptids aus Gerste (Rogers und Milliman, 1983) unter der Kontrolle eines modifizierten Patatinpromotors aus Kartoffel. Als Terminator befindet sich hinter dem Lysozymgen das CaMV 35S Polyadenylierungssignal. Mit einem Asp718-Restriktionsverdau wurde der Patatinpromotor herausgeschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, und das *GapC4* Promotorfragment in die aufgefüllte Schnittstelle des Vektors kloniert. Mittels eines asymmetrischen Schnitts innerhalb des Promotors wurden die Klone mit der richtigen Orientierung bezogen auf das Lysozymgen ermittelt. Der resultierende Vektor pSR8-48 trägt somit die Genkassette mit *GapC4* Promotor, Lysozymgen und Terminationssignal.

Da sich vor dem Promotor und hinter dem Terminator jeweils Schnittstellen für HindIII, SphI und PstI befinden, kann die gesamte Expressionskassette zur weiteren Klonierung nur über diese Enzyme herausgeschnitten werden. Da der binäre Vektor pSR8-39 (A. Jahnke und K. Düring, unveröffentlicht), in den die Kassette überführt werden sollte, als einzige Klonierungsstelle eine HindIII Schnittstelle besitzt, hätte es sich angeboten, die Kassette mit HindIII aus pSR8-48 herauszuschneiden, um sie in pSR8-39 zu überführen. Dies ist jedoch nicht möglich, da der *GapC4* Promotor 2 interne HindIII Schnittstellen besitzt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in pSR8-39 eine zusätzliche XbaI Schnittstelle eingebaut. Der binäre Vektor wurde mit HindIII aufgeschnitten, und es wurde ein synthetischer 5' phosphorylierter Linker mit der Sequenz 5'AGCTTCTAGA3' verwendet, um die zusätzliche XbaI Schnittstelle zu generieren. Die sechs Basen am 3'-Ende des Oligonukleotids beinhalten die palindromische Erkennungssequenz für XbaI. Über diese sechs Basen können zwei gleiche Oligonukleotide miteinander hybridisieren, wobei ein doppelsträngiger Linker entsteht, der in seiner Mitte über eine XbaI Schnittstelle und an seinen beiden Enden über HindIII kompatible Überhänge verfügt. Der binäre Vektor mit der zusätzlichen XbaI Klonierungsstelle wurde pSR8-52 genannt. Desweiteren mußte die Kassette aus pSR8-48 mit PstI herausgeschnitten und in einen Vektor überführt werden, der zwei flankierende XbaI um eine PstI Schnittstelle besitzt. Um einen solchen Vektor zu konstruieren, wurde pUC19 mit HindIII aufgeschnitten, und mit dem zuvor beschriebenen Linker wurde eine zusätzliche XbaI Schnittstelle eingefügt. Es ergab sich daraus der Vektor pXba, der nun über eine PstI Schnittstelle verfügt, die von zwei XbaI Schnittstellen flankiert wird. Um die Kassette über XbaI aus pXba herausschneiden zu können, mußte zunächst die XbaI Schnittstelle in pSR8-48, die sich zwischen dem Lysozymgen und dem Terminator befindet, entfernt werden. Dies wurde erreicht, indem pSR8-48 durch einen Schnitt mit XbaI, Auffüllen mit Klenow-Polymerase und anschließender Religation in pSR8-49 umgewandelt wurde. In den Vektor pXba wurde daraufhin die Kassette aus pSR8-49 mittels PstI kloniert. Daraus resultierte der Vektor pSR8-51, aus welchem sich mittels XbaI-Verdau die Kassette in die XbaI Schnittstelle von pSR8-52 überführen ließ. Damit war der binäre Vektor pSR8-53, der das T4-Lysozymgen mit vorgeschalteter DNA-Sequenz des Gerste- α -Amylase-Signalpeptids unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors und den CaMV 35S Terminator trägt, konstruiert. Außerdem befindet sich das *nptII* Gen als pflanzlicher Selektionsmarker zwischen der rechten und linken T-DNA Border, um

Kanamycinresistenz in Pflanzen zu vermitteln. Der binäre Vektor wurde in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV 3101 (Koncz und Schell, 1986; Koncz et al., 1987) überführt.

2.2.6 *GapC4-lys* in pOCA28

Hierbei handelt es um die gleiche Kassette wie unter 2.2.5 beschrieben. Für die Klonierung der Expressionskassette in pOCA28 wurde das *Xba*I-Fragment aus pSR8-51 in die *Xba*I Schnittstelle von pOCA28 überführt. Anschließend wurde dieser Vektor in *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 transformiert. Die aus der Transformation mit diesem Konstrukt resultierenden Pflanzen werden 6-x genannt.

2.2.7 Übersicht über die verwendeten Konstrukte

Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die zur Kartoffeltransformation verwendeten Konstrukte.

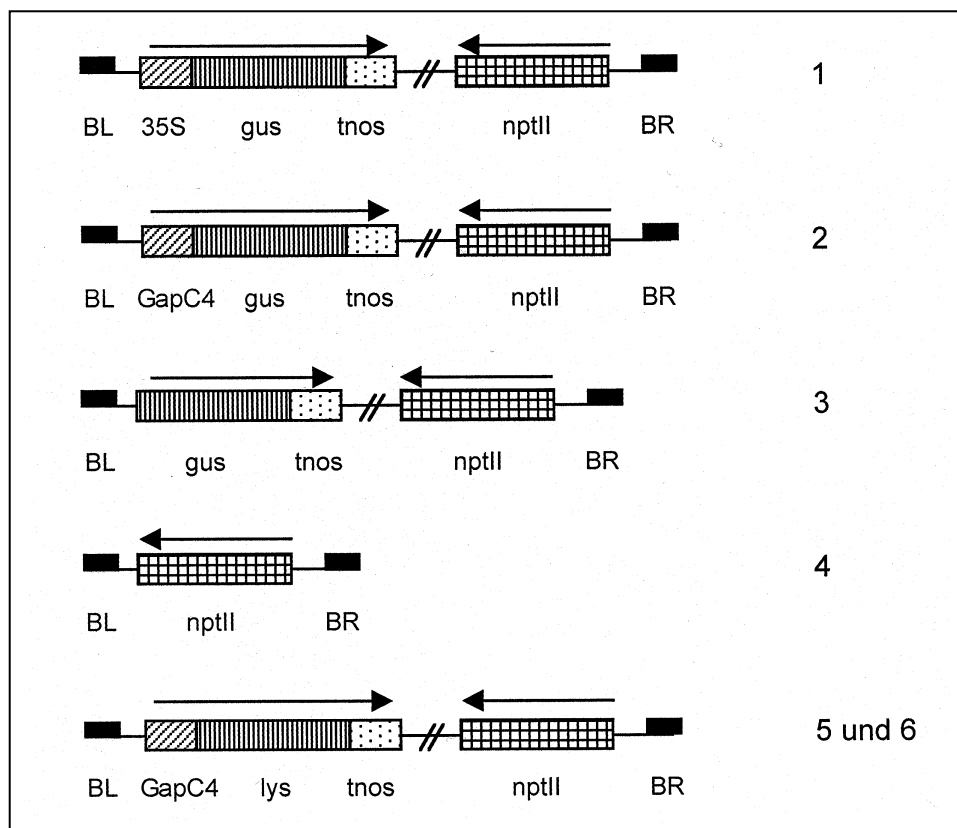


Abb. 1: Übersicht über die zur Kartoffeltransformation verwendeten Konstrukte

35S: CaMV 35S Promotor, GapC4: Mais *GapC4* Promotor, gus: Gen für β -Glucuronidase, lys: T4-Lysozymgen mit vorangestellter DNA-Sequenz des α -Amylase-Signalpeptids, tnos: Nopalinsynthase-Terminationssignal, nptII: Kanamycinresistenzgen, BL: T-DNA left border, BR: T-DNA right border

2.3 Agrobakterientransformation

Um mittels Elektroporation Plasmid-DNA in Bakterien zu überführen, wurde ein Protokoll von Nagel et al. (1990) modifiziert. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden die zu transformierenden Agrobakterien in einer 2 ml Übernachtskultur bei 28°C in CPY-Medium kultiviert. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums wurde gewährleistet, daß die Bakterien ihre Ti-Plasmide nicht verlieren. Die bewachsene Übernachtskultur wurde in 250 ml CPY-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und bei 28°C geschüttelt. Nachdem die Bakteriensuspension bei 550 nm Wellenlänge eine OD zwischen 0,5 und 1,0 gegen Medium erreicht hatte, wurden die Zellen bei 4°C und 4000g 15 min lang abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 ml sterilem 1 mM Hepes/KOH pH 7,0 resuspendiert und erneut 15 min zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 125 ml Hepespuffer suspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Bakterienpellet in 100 ml sterilem 10% Glycerin resuspendiert, nochmals zentrifugiert und in 750 µl 10% Glycerin aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots zu je 40 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 1 µl Plasmid DNA mit einer Konzentration von etwa 1 µg/µl gegeben. Die Transformation wurde in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand mit einem Bio-Rad Elektroporator bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in 1 ml flüssiges CPY-Medium ohne Antibiotika gegeben und 2 Stunden bei 28°C inkubiert. Plattiert wurde auf CPY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für Ti-Plasmid und binären Vektor. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 28°C waren die Platten mit einzelnen Kolonien transformierter Agrobakterien bewachsen.

2.4 Kartoffeltransformation

Die durch Agrobakterien vermittelte Kartoffeltransformation erfolgte mit Hilfe der „Leaf Disc“ Technik in adaptierter Form nach Horsch et al. (1985). Zunächst wurde ein *A. tumefaciens* Klon mit dem zu transformierenden binären Vektor in 5 ml YEB-Medium (5 g/l beef extract, 1 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 2 mM MgSO₄, pH 7,4) Flüssigkultur unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika 2 Tage bei 28°C unter kräftigem Schütteln inkubiert.

Nach 2 Tagen wurden Blätter von etwa 4 Wochen alten nicht transgenen Sterilkulturpflanzen der Kartoffelsorte Désirée zur Transformation benutzt. Die Blattspreiten wurden abgeschnitten, die Mittelrippe eingeschnitten, und es wurden je 10 Blätter mit der Blattoberseite nach unten in eine Petrischale mit flüssigem MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit 2% Saccharose gelegt. 50 µl der *A. tumefaciens*-Kultur wurden unter leichtem Schütteln hinzugefügt und die Blätter 2 Tage lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Co-Inokulation wurden die Blätter mit der Blattoberseite nach unten auf festes Medium zur Kallusinduktion (MS-Medium mit 1,6% Glucose, 5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin) gelegt. Nach einer Woche wurden die Blätter auf Medium zur Sproßinduktion (MS-Medium mit 1,6% Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 20 µg/l NAA, 20 µg/l GA₃, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin) umgelegt. Dieser Vorgang wurde alle 10 Tage wiederholt. Nach etwa 4 bis 8 Wochen wuchsen aus den inzwischen entstandenen Kalli Sprosse, die abgeschnitten und in Magentadosen oder Weckgläser mit MSCK-Medium (MS-Medium mit 1,6% Glucose, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin) gepflanzt wurden, wo die Sprosse bewurzelten und sich zu ganzen Pflanzen entwickelten.

2.5 Nachweis persistierender Agrobakterien

Bei transgenen Sterilkulturpflanzen, die mittels Agrobakterien transformiert wurden, besteht die Möglichkeit, daß sich noch Agrobakterien auf oder in den Pflanzen befinden. Dies kann dazu führen, daß bei GUS-Tests falsche Ergebnisse erzielt werden, da die Agrobakterien auf ihren binären Vektoren die gleichen Konstrukte tragen wie die transgenen Kartoffelpflanzen. Die Gene für die β -Glucuronidase werden zwar von den Pflanzenpromotoren *GapC4* und 35S kontrolliert, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß diese Promotoren auch im Bakterium aktiv sind. Außerdem muß aus Gründen der biologischen Sicherheit vor dem Ausbringen der Pflanzen in das Gewächshaus zwecks Knollenproduktion gewährleistet sein, daß sich keine Agrobakterien mehr in dem auszupflanzenden Material befinden. Zur Untersuchung der Sterilkulturpflanzen auf persistierende Agrobakterien wurde eine Methode nach Matzk et al. (1996) verändert. Die zu untersuchende Sterilkulturpflanze wurde halbiert, der obere Teil wurde unter sterilen Bedingungen homogenisiert und in 20 ml YEB-Medium bei 28°C bis zur Trübung des Mediums, längstens eine Woche lang, geschüttelt. Stellte sich eine Trübung ein, wurde ein Aliquot der Suspension auf YEB-Medium unter Zugabe der entsprechenden

Antibiotika plattiert und bei 28°C inkubiert. Beim Auftreten von schleimigen Kolonien nach spätestens 4 Tagen konnte davon ausgegangen werden, daß sich noch persistierende Agrobakterien auf oder in den Pflanzen befanden. In solchen Fällen wurden die Sterilkulturpflanzen in MS-Medium mit Claforan umgesetzt. Nach 4 Wochen wurde der Test wiederholt.

2.6 Knollenproduktion

Von Agrobakterien freie Sterilkulturpflanzen wurden zunächst in Erde in kleinen Töpfen ausgepflanzt, in denen sie bis zu einer Größe von etwa 20 cm wuchsen. Dies wurde in Minigewächshäusern innerhalb einer Klimakammer durchgeführt. Daraufhin wurden die Pflanzen zur Knollenproduktion in größere etwa 10 Liter fassende Töpfe gesetzt und in ein S1 Gewächshaus gestellt. Nach der Ernte der Knollen wurden diese in Papierbeuteln bei ca. 4°C und guter Durchlüftung gelagert. Die nicht transgenen Kontrollknollen wurden unter gleichen Bedingungen produziert.

2.7 Anaerobiose

Zur anaeroben Inkubation von Blättern, Stengeln, Wurzeln und Knollenscheiben der Kartoffel wurde der Anaerocult-Kit der Fa. Merck verwendet. Dieser besteht aus einem Anaerobentopf als gasdichtes Behältnis, Anaerocult A, einem Kieselgel, welches nach Befeuchtung Sauerstoff bindet und CO₂ freisetzt und so für anaerobe Bedingungen sorgt, und Anaerotest, einem Teststäbchen, um die Anaerobiose zu kontrollieren.

Zur Inkubation von Blättern, Stengeln und Wurzeln wurde Pflanzenmaterial aus Sterilkultur verwendet. Die Pflanzenteile wurden auf befeuchtetes Filterpapier in Petrischalen gelegt und im Anaerobentopf platziert. Das Gewebe wurde 40 Stunden lang im Pflanzenkulturschrank bei 22°C und einem 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit Zyklus anaerob inkubiert. Die aeroben Kontrollen wurden ebenfalls auf befeuchtetes Filterpapier in Petrischalen gelegt und außerhalb des Anaerobentopfs im Pflanzenkulturschrank aerob inkubiert.

Da die Kartoffelknollen im Gewächshaus produziert worden waren, wurden sie zunächst sterilisiert, denn anhaftende Mikroorganismen könnten aufgrund ihrer β -Glucuronidase-Aktivität die GUS-Tests verfälschen. Da gesunde Knollen im Innern keimfrei sind (J. Lottmann, pers. Mitteilung), reicht hierfür eine Sterilisierung der Schale wie unter 2.9 beschrieben aus. Die oberflächensterilisierten Knollen wurden geschält und in Scheiben

geschnitten, aus denen Scheiben mit einem definierten Durchmesser ausgestanzt wurden. Diese wurden auf befeuchtetes Filterpapier in Petrischalen in den Anaerobentopf gelegt und 40 Stunden lang bei 22°C in Pflanzenkulturschrank anaerob inkubiert. Die aeroben Kontrollen wurden ebenfalls sterilisiert, in Scheiben geschnitten und auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen 40 Stunden lang im Pflanzenkulturschrank gelagert.

2.8 Histochemischer GUS Test mit Blättern, Stengeln und Wurzeln

Hierzu wurde hauptsächlich Pflanzenmaterial aus der Sterilkultur verwendet. Falls Gewebe aus dem Gewächshaus verwendet wurde, so war sicherzustellen, daß dieses von gesunden Pflanzen stammte, denn bakterieller Befall hätte zu falsch positiven Ergebnissen führen können, da die β -Glucuronidase ein weitverbreitetes Enzym ist. Bei Gewächshausmaterial wurde stets durch eine Kontrolle mit einer nicht transgenen Pflanze sichergestellt, daß keine Kontamination durch einen β -Glucuronidase produzierenden Mikroorganismus vorlag. Unmittelbar nach der aeroben und anaeroben Inkubation der Pflanzenteile wurde mit den inkubierten Blättern, Stengeln und Wurzeln ein histochemischer GUS Test durchgeführt. Das Gewebe wurde mit GUS-Färbepuffer (12mg X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid), in 200 μ l DMSO gelöst, 400 μ l 12,4 M β -Mercaptoethanol, aufgefüllt auf 10 ml mit 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,0) 3 mal vakuumfiltriert. Das Pflanzenmaterial wurde auf befeuchtetem Filterpapier bei 37°C über Nacht inkubiert. Aus den grünen Gewebeteilen wurde das Chlorophyll durch eine Behandlung mit 96% EtOH entfernt, um die Färbung besser erkennen zu können. Diese Behandlung hat keinen Einfluß auf die Färbung, denn der durch die Umsetzung von X-Gluc mit β -Glucuronidase entstehende blaue Farbstoff ist in Wasser und Ethanol unlöslich.

2.9 Histochemischer GUS Test mit Gewächshausknollen nach aerober und anaerober Inkubation

Da es bei Knollen, die aus der Erde des Gewächshauses stammen, sehr wahrscheinlich ist, daß diesen Mikroorganismen anhaften, wurden die Oberflächen der Knollen zunächst sterilisiert. Dazu wurde ein Protokoll nach McInroy (McInroy und Kloepper, 1994) modifiziert. Eine ganze Knolle wurde 10 min lang in 1,05% Natriumhypochlorid geschüttelt, wobei die gesamte Knolle mit dem Desinfektionsmittel bedeckt war. Anschließend wurde die Knolle in sterilem

dest. Wasser gespült. Desinfektion und Spülen wurden zweimal wiederholt. Die Knolle wurde daraufhin mit einem abgeflammtten Messer geschält und in 4 bis 5 mm dicke Scheiben geschnitten. Aus diesen Scheiben wurden mehrere kleinere kreisrunde Scheiben mit einem Durchmesser von 20 mm ausgestanzt. Die Knollenscheiben wurden daraufhin wie unter 2.7 beschrieben aerob und anaerob inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Scheiben vakuuminfiltriert. Als Färbepuffer wurde dazu die unter 2.8 beschriebene Lösung verwendet, der zur besseren Penetration des Substrats in die Zellen der Knollen 0,5% Triton X-100 zugegeben wurde. Außerdem wurden etwa 1 mm dünne Schnitte der Scheiben mit einem Skalpell angefertigt, um das Eindringen der Färbelösung während der Vakuuminfiltration zu erleichtern. Nach der Infiltration wurde das Gewebe bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.10 Histochemischer GUS Test mit Gewächshausknollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

Eine mit Ethanol sterilisierte Frischhaltebox für Lebensmittel wurde etwa 1 cm hoch mit Wasser befüllt und in Höhe von etwa 2 cm ein Gitter eingesetzt. Darauf wurde Filterpapier gelegt, das an den Enden in das Wasser eintauchte, und somit immer befeuchtet war. Gewächshausknollen wurden wie in 2.9 beschrieben oberflächensterilisiert und geschält. Aus den Knollen wurden Scheiben ausgestanzt, die auf das befeuchtete Filterpapier in der Box gelegt wurden. Die Knollenscheiben wurden in der Mitte mit einer Nadel etwa 2 mm tief eingestochen. Auf diese Verwundung wurden 2 µl einer Suspension von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* 549 (*E.c.a.*, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK), die über Nacht in 5 ml *Erwinia*-Medium (2 g/l (NH₄)₂SO₄, 4 g/l KH₂PO₄, 6 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l MgSO₄, 1 mg/l FeSO₄·7 H₂O, 1 mg/l CaCl₂, 1 g/l PGA, pH 6,7) bei 28°C angezogen worden war, gegeben. Die Box wurde mit einem Deckel verschlossen und 40 h im Pflanzenkulturschrank bei 22°C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Knollenscheiben vollständig mazeriert. Die histochemische Anfärbung erfolgte mit X-Gluc-Puffer, dem 0,5% Triton X-100 zur besseren Penetration der Zellen und 100 mg/l Streptomycin zur Inhibierung des bakteriellen Wachstums zugesetzt wurde.

Erwinia carotovora exprimiert keine β-Glucuronidase, die zu einem falsch positiven Signal hätte führen können (G. P. C. Salmond, pers. Mitteilung). Dies wurde überprüft, indem die Bakterien auf einer Agarplatte aus *Erwinia*-Medium mit 1,2 g/l X-Gluc wuchsen, ohne daß

eine Blaufärbung detektierbar war. Außerdem bestätigte der histochemische GUS-Test mit nicht transgenen Knollenscheiben nach Infektion mit *Erwinia*, daß weder durch die Bakterien noch die Knollenscheibe Hintergrundsignale hervorgerufen wurden.

Um zu verhindern, daß es in der Infektionsbox zu einem Mangel an Sauerstoff infolge von bakterieller Sauerstoffzehrung kommen könnte, wurde der Versuchsaufbau modifiziert. Dabei wurde die Box nach Verwundung und Infektion der Knollenscheiben mit offenem Deckel 40 h lang in die Sterilbank gestellt. Dies verhinderte Kontaminationen und bewirkte, daß ein ständiger steriler Luftstrom über die infizierten Knollenscheiben strömte, was sicherstellte, daß es zu keiner Sauerstofflimitierung kommen konnte.

2.11 Fluorimetrischer GUS Test

Zur Quantifizierung der β -Glucuronidase-Aktivität wurden nach aerober oder anaerober Inkubation bzw. nach *Erwinia*-Infektion etwa 100 mg Gewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 100 μ l GUS-Extraktionspuffer (50 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 10 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,4% Sarkosyl, 10 mM β -Mercaptoethanol) gemörsert. Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Proteingehalt des Überstands wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Auf 50 μ l Reaktionslösung (GUS-Extraktionspuffer mit 333 mg/l Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG)) wurden 10 μ l des Überstands gegeben. Davon wurden für den Nullwert sofort 10 μ l abgenommen und in 500 μ l Stopp-Puffer (0,2 M Na_2CO_3) gegeben. Die restlichen 50 μ l des Reaktionsansatzes wurden bei 37°C inkubiert. Nach 30, 60 und 90 min wurden jeweils weitere 10 μ l abgenommen und in 500 μ l Stopp-Puffer gegeben. Die Fluoreszenzen der abgestoppten Reaktionsansätze wurden in einem Fluorimeter bei einer Anregung von 365 nm und Emission von 455 nm Wellenlänge gemessen. Das Fluorimeter wurde mit verschiedenen hoch konzentrierten Methylumbelliferon (MU)-Lösungen in Stopp-Puffer geeicht. Die Steigung der Regressionsgerade für die MU-Meßwerte gegen die Zeit ergab die Aktivität der β -Glucuronidase in pmol MU/h. Diese wurde zur eingesetzten Gesamtproteinmenge ins Verhältnis gesetzt, wodurch die relative Aktivität mit der Einheit pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein errechnet werden konnte. Alle Aktivitäten wurden durch mindestens zwei unabhängige Messungen bestimmt.

2.12 Teilweise Mazeration von Knollenscheiben

Transgene *GapC4*-GUS Knollen der Linien 2-13 und 2-17 wurden oberflächensterilisiert, und aus den Knollen wurden große Scheiben von etwa 6 cm Durchmesser geschnitten. Die Inkubation mit *Erwinia carotovora* wurde unter sterilen Bedingungen in der Box für die Infektionstests durchgeführt. Die Knollenscheiben wurden in der Mitte verwundet und mit *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* infiziert. Die Mazeration der Knollenscheibe wurde nach 24 h beendet, indem der mazerierte Teil des Gewebes in der Mitte der Scheibe entfernt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, daß die weiche infizierte Substanz gründlich ausgeschabt wurde, so daß ein Ring aus festem nicht mazerierten Gewebe übrig blieb.

Zunächst wurden die partiell mazerierten Knollenscheiben histochemisch untersucht. Damit der Färbepuffer das feste, intakte Gewebe besser penetrierte, wurden aus den Ringen mit einem Skalpell etwa 1 mm starke Dünnschnitte hergestellt. Diese wurden dann mit dem GUS-Färbepuffer vakuuminfiltriert, dem zum besseren Eindringen in das Gewebe 0,5% Triton X-100 und zum Abstoppen des bakteriellen Wachstums 100 mg/l Streptomycin zugegeben wurde.

Außerdem wurden die teilweise mazerierten Knollenscheiben quantitativ auf β -Glucuronidase-Aktivität analysiert. Hierfür wurden aus den Knollenscheiben in Abständen von 0 mm bis 2 mm, 2 mm bis 4 mm und 20 mm, gemessen von der Grenze der Mazeration nach außen hin, Gewebe herausgeschnitten und fluorimetrisch auf GUS-Aktivität untersucht. Zur Kontrolle wurde außerdem das mazerierte Gewebe aus dem Inneren der Knollenscheibe sowie jeweils eine aerob inkubierte Knollenscheibe analysiert. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf den Mittelwerten von jeweils 2 unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

2.13 Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase im Knollengewebe

Um das Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase im Knollengewebe zu untersuchen, wurde das nachfolgend beschriebene Experiment durchgeführt. Eine transgene Knolle der Linie 2-13 wurde oberflächensterilisiert, geschält und in 4 bis 5 mm dicke Scheiben geschnitten. Daraus wurden runde Scheiben mit einem Durchmesser von 20 mm ausgestanzt. Eine nicht transgene Kontrollknolle wurde ebenfalls so behandelt und in Scheiben geschnitten, aus denen Knollenscheiben gleichen Durchmessers gestanzt wurden. In den übrig gebliebenen äußeren nicht transgenen Ring wurde die Knollenscheibe der Linie 2-13 gedrückt. Daraus ergab sich

eine große Knollenscheibe mit einem transgenen Kern und einem nicht transgenen Mantel, wobei der Übergang vom transgenen zum nicht transgenen Gewebe durch die Verwendung des gleichen Stanzwerkzeugs bei der Herstellung von Knollenscheibe und Ring lückenlos war. Diese zweiteilige Knollenscheibe wurde auf feuchtes Filterpapier in eine Box für Knollenscheibentests gelegt. In der Mitte des transgenen Kerns wurde die Knollenscheibe verwundet und mit einer *Erwinia carotovora*-Suspension infiziert. Bei 22°C wurde so lang inkubiert, bis der innere transgene Teil der Knollenscheibe größtenteils mazeriert war. Daraufhin wurde das innere transgene und mazerierte von dem äußeren nicht transgenen und festen Gewebe getrennt, und beides wurde separat histochemisch angefärbt.

Der Versuch wurde auch mit umgekehrter Plazierung des inneren und äußeren Gewebes durchgeführt. In einen Knollenscheibenring der Linie 2-13 wurde eine nicht transgene Scheibe Knollengewebe eingepaßt. Verwundet und infiziert wurde in der Mitte des nicht transgenen Kerns, und es wurde so lang inkubiert, bis der Kern mazeriert, jedoch der äußere transgene Ring noch nicht infiziert war. Die Gewebe wurden daraufhin voneinander getrennt histochemisch analysiert.

2.14 Herstellung eines *Erwinia*-Extrakts

Eine Vorkultur *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* 549 wurde durch Beimpfen von 200 ml *Erwinia*-Medium und anschließendem zweitägigen Schütteln bei 28°C hergestellt. Die gesamte Vorkultur wurde in 2000 ml *Erwinia*-Medium überführt und weitere 2 Tage bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, und das Pellet wurde in 20 ml *Erwinia*-Medium aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde für 2 Stunden bei 28°C geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml einer 10 mg/ml Hühnereiweiß-Lysozymlösung in PBS wurde eine weitere Stunde bei 28°C geschüttelt. Daraufhin wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort wieder aufgetaut. Nach einer einminütigen Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch dreimaliges Zentrifugieren abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand sterilfiltriert.

2.15 Herstellung eines Extrakts aus *Erwinia*-infizierten Knollenscheiben

Ein Extrakt aus von *Erwinia* mazerierten Knollen wurde hergestellt, indem sterile Knollenscheiben von nicht transgenen Kartoffeln der Sorte Désirée mit *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 547 infiziert wurden. Die Knollenscheiben wurden in einer Schale mit feuchtem

Filterpapier wie bei den Knollenscheibentests 40 h bei 28°C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Knollenscheiben vollständig mazeriert. Die mazerierten Knollenscheiben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde ein gleiches Volumen *Erwinia*-Medium gegeben und mit dem mazerierten Gewebe vermischt. Die Suspension wurde mit einem Ultra-Turrax T8 Dispergierwerkzeug homogenisiert, das Homogenisat wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 2 weitere Male zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand sterilfiltriert.

2.16 Knollenscheibentests mit *Erwinia*-Extrakten und aufgereinigten pektolytischen Enzymen

Als aufgereinigte pektolytische Enzyme wurden

- Pektatlyase C, PelC, Produkt des pelC-Gens aus *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Hinton et al., 1989),
- Polygalakturonase, PG, Produkt des peh-Gens aus *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Hinton et al., 1990),
- Pektinmethylesterase, PME, Produkt des pem-Gens aus *Erwinia chrysanthemi* (Laurent et al., 1993) und
- Cellulase V, CelV, Produkt des celV-Gens aus *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Cooper und Salmond, 1993) verwendet.

Die rekombinanten Enzyme waren in *Escherichia coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt worden (Winkler, 1998). Sie wurden freundlicherweise von Thomas Winkler zur Verfügung gestellt.

Der Knollenscheibentest wurde mit Knollen der transgenen *GapC4*-GUS Linien 2-13 und 2-17 durchgeführt. Die Knollen wurden oberflächensterilisiert, geschält und wie bereits beschrieben in Scheiben geschnitten. Die Inkubation erfolgte auf feuchtem Filterpapier in einer Schale für Knollenscheibentests. Inokuliert wurden jeweils 3 Knollenscheiben beider Linien mit 20 µl Extrakt aus *Erwinia* mazerierten Knollen, 10 µl *Erwinia*-Extrakt, einer Mischung bestehend aus 0,5 µg PelC und 0,5 µg PG, sowie mit einer Kombination von 0,5 µg PelC, 0,5 µg PG, 0,5 µg PME und 0,5 µg CelV. Als Positivkontrolle wurden die Knollenscheiben mit 10 µl einer *Erwinia*-Kultur beimpft, als Negativkontrolle wurden 10 µl *Erwinia*-Medium aufgetragen. Die Knollenscheiben wurden unter sterilen Bedingungen 40 h lang bei 28°C inkubiert und anschließend histochemisch angefärbt.

Bei einem weiteren Knollenscheibentest wurden die *Erwinia*-Enzyme einzeln eingesetzt. Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17 wurden wie vorstehend beschrieben hergestellt und mit 0,5 µg PelC, PG, PME oder CelV 40 h lang bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde der Mazerierungsgrad ermittelt und die Knollenscheiben histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht.

2.17 Inaktivierung pektolytischer Enzyme

Zur Herstellung von Oligogalakturoniden für einen Knollenscheibentest wurden Pektin und Polypektat durch pektolytische Enzyme partiell verdaut. Um einen kompletten Abbau zu Digalakturoniden zu verhindern, wurde die Reaktion rechtzeitig abgestoppt. Dazu war zunächst die Entwicklung einer Methode zur Inaktivierung pektolytischer Enzyme nötig. Pektolytische Enzyme lassen sich durch Hitzebehandlung allein nicht vollständig inhibieren (Winkler, 1998). Es wurde aber gezeigt, daß eine Behandlung mit Proteinase K zur Inaktivierung pektolytischer Enzyme führt. Nach anschließender Hitzebehandlung läßt sich die Proteinase K denaturieren (Angabe des Herstellers Boehringer Mannheim). Die Inaktivierung der pektolytischen Enzyme wird über eine Aktivitätsmessung nachgewiesen. Um die Aktivität pektolytischer Enzyme zu ermitteln, wurde die Bildung von Oligogalakturoniden, die beim pektolytischen Abbau von Polypektat entstehen, in einem Test nach Keen et al. (1984) photometrisch bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt.

2.18 Herstellung von Oligogalakturoniden aus Polypektat und Pektin

Zur Herstellung von Oligogalakturoniden wird Polypektat oder Pektin mit Hilfe von pektolytischen Enzymen in kleinere Bruchstücke gespalten. Um die vollständige Spaltung zu Digalakturoniden zu verhindern, wird zum einen die Reaktion nach einer bestimmten Zeit durch Inaktivierung der Enzyme gestoppt, und zum anderen wird das Substrat im Überschuß zugegeben.

Zu 50 mg Polypektat wurden 460 µl *Erwinia*-Medium sowie 40 µl 2,5 µg/µl PelC gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde der Reaktionsansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 50 µl einer 14 µg/µl Proteinase K Lösung in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde geschüttelt und 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min gekocht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Mit einer Mischung aller pektolytischen Enzyme eines *Erwinia*-Extrakts wurden ebenfalls Oligogalakturonide hergestellt. Zu 50 mg Polypektat wurden 500 µl *Erwinia*-Extrakt gegeben. Reaktion und Inaktivierung wurden wie vorstehend beschrieben durchgeführt.

Als Kontrollen wurden zu 50 mg Polypektat einmal 40 µl PelC (2,5 µg/µl) und zum anderen 500 µl *Erwinia*-Extrakt gegeben. Die Spaltung wurde 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden die Reaktionsansätze weder mit Proteinase K behandelt noch hitzeinaktiviert, sondern direkt bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Diese Kontrollen enthielten somit neben den Oligogalakturoniden auch aktive pektolytische Enzyme. Durch einen Test gemäß 2.17 wurde sichergestellt, daß die Extrakte nach einmaligem Einfrieren noch pektolytisch aktiv waren. Als weitere Kontrolle wurde *Erwinia*-Medium mit 50 mg Polypektat 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eingefroren.

Zur Herstellung von Oligogalakturoniden aus Pektin wurden bei den vorstehend beschriebenen Reaktionsansätzen anstelle von Polypektat 50 mg Pektin als Substrat eingesetzt.

2.19 Knollenscheibentest mit Oligogalakturoniden

Knollen der Linien 2-13 und 2-17 wurden oberflächensterilisiert, geschält und in Scheiben geschnitten. Daraus wurden Knollenscheiben einheitlicher Größe ausgestant. Die Knollenscheiben wurden in Boxen auf feuchtes Filterpapier gelegt, durch einen Einstich verwundet und inokuliert. Als Inokulum wurden jeweils 40 µl der unter 2.18 beschriebenen Lösungen mit Oligogalakturoniden verwendet. Außerdem wurden jeweils 40 µl der unter 2.18 beschriebenen Kontrollansätze aufgetragen. Als weitere Kontrollen wurden 40 µl *Erwinia*-Medium und 10 µl einer *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* Suspension auf jede Knollenscheibe gegeben. Die Knollenscheiben wurden 48 Stunden bei 22°C im Klimaschrank inkubiert und anschließend histochemisch angefärbt.

2.20 Resistenztest

Zur Untersuchung des Resistenzverhaltens von Knollen wurden fünf Knollenscheibentests (Düring et al., 1993; Yang et al., 1989) durchgeführt, bei denen aus Knollen kleine Scheiben definierter Größe gestant, verwundet und mit einer bestimmten Anzahl Bakterien inokuliert wurden. Die Knollenscheiben wurden wie bereits beschrieben aus oberflächensterilisierten Knollen hergestellt und in eine Inkubationsbox (Gieffers et al., 1989) auf feuchtes Filterpapier gelegt. Zur Herstellung einer Infektionssuspension war *Erwinia*-Medium einen Tag vorher mit

einer *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* - Kultur angeimpft und 24 Stunden bei 28°C geschüttelt worden. Die Bakteriensuspension wurde vor der Infektion der Knollenscheiben mit *Erwinia*-Medium 1:10 verdünnt und einige Stunden bei 28°C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ der Suspension zwischen 0,2 und 0,4 lag. Zu dieser Zeit befanden sich die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und somit in ihrem optimalen physiologischen Zustand. Aus der gemessenen OD₆₀₀ wurde die Zelldichte errechnet, wobei davon ausgegangen wurde, daß die Zellkonzentration bei einer OD₆₀₀=1 8×10^8 Zellen pro ml beträgt. Die gewünschte Menge Zellen wurde abzentrifugiert, das Pellet in 0,3x PBS aufgenommen und die Suspension auf 1000 Zellen pro µl verdünnt. Eine definierte Menge Zellen wurde nach Verwundung der Knollenscheibe in deren Mitte pipettiert. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 22°C wurden die Knollenscheiben gewogen, bevor das mazerierte Gewebe unter fließendem Wasser und leichtem mechanischen Druck abgespült wurde. Danach wurden die Scheiben erneut gewogen, und aus dem Verhältnis beider Werte wurde der prozentuale Anteil intakten Gewebes berechnet. Die Knollenscheibentests wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Variiert wurde die Menge des Inokulums, die Dauer der Inkubation und die Methode der Verwundung, die der Knollenscheibe mit einer sterilen Nadel beigebracht wurde. Während beim ersten Knollenscheibentest eine konventionelle Nadel benutzt wurde, bei der die Einstichtiefe von Scheibe zu Scheibe variieren konnte, wurde bei den weiteren Tests mit einem verbesserten Instrument gearbeitet, bei dem die Einstichtiefe konstant 2,5 mm betrug. Die Anzahl eingesetzter Bakterien betrug beim ersten Test 2000 Bakterien pro Knollenscheibe, bei allen weiteren Tests wurde mit 5000 Bakterien pro Scheibe infiziert. Die Gesamtheit der erhaltenen Daten wurden mittels univariater Varianzanalyse, Post-Hoc-Prozedur, Tukey-Test statistisch ausgewertet. Dafür wurde das Computerprogramm SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

2.21 Northern Blot

Um zu testen, ob der CaMV 35S Promotor unter anaeroben Bedingungen aktiv ist, wurden Blätter der Sterilkulturpflanzen der Linien DL4 und DL12 für 8 h bei 22°C aerob und anaerob inkubiert. Diese Linien tragen das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des 35S Promotors. Mit dem Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) wurde deren Gesamt-RNA extrahiert. 20 µg

Gesamt-RNA wurde nach Anleitung des Kits in einem Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) geblottet.

Zur Herstellung einer Sonde für die Hybridisierung wurde das T4-Lysozymgen in den Vektor pSPT18 (Boehringer Mannheim) kloniert. Mittels RNA-Polymerase und durch Zugabe von DIG-markierten Nukleotiden wurde eine Sonde für T4-Lysozym in „Antisense“ Richtung transkribiert. Die Hybridisierung wurde mit dieser RNA-Sonde durchgeführt. Die Transkription, Hybridisierung und Detektion erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers Boehringer Mannheim.

2.22 Abkürzungen

35S	CaMV 35S
Adh	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaar(e)
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
Cel	Cellulase
Desi	Kartoffel der Ausgangssorte Désirée
DIG	Digoxigenin
<i>E.c.a.</i>	<i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i>
GA ₃	Gibberellinsäure A ₃
GapC4	Mais Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
Lys	Lysozym
kb	Kilobasenpaare
KST	Knollenscheibentest
MS	Pflanzenmedium nach Murashige und Skoog (1962)
MU	Methylumbelliferon
MUG	Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid

NAA	1-Naphthalinessigsäure
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PG	Polygalakturonase
PGA	Polypektat
PME	Pektinmethylesterase
T4	Bakteriophage T4
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid

3 Ergebnisse

3.1 Aktivität des CaMV 35S Promotors in der Kartoffel unter anaeroben Bedingungen

Der CaMV 35S Promotor, der als starker konstitutiver Pflanzenpromotor bekannt ist, wird in Mais unter anaeroben Bedingungen abgeschaltet (Uwe Köhler, pers. Mitteilung). Die Vermutung, daß dies auch für die Kartoffel zutrifft, sollte belegt werden. Das Abschalten der Transkription durch einen Promotor ist auf Proteinebene nicht genau meßbar, da Proteine in der Pflanze über den Abschaltvorgang hinaus vorliegen können, falls sie nicht schnell genug abgebaut werden. Bei der β -Glucuronidase handelt es sich um ein besonders stabiles Enzym, das in der Kartoffel nur sehr langsam abgebaut wird (siehe 3.8). Dies bedeutet, daß mit diesem Reporterprotein zwar ein Induktionsvorgang nachweisbar ist, jedoch das Abschalten des Promotors auf Proteinebene, z.B. histochemisch oder fluorimetrisch, nicht meßbar ist.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde das Abschaltverhalten des 35S Promotors auf Transkriptionsebene untersucht. Dies ist möglich, da mRNA in Pflanzen in der Regel relativ schnell abgebaut wird (Higgs et al., 1995). Für diese Untersuchung wurde auf die bereits vorhandenen transgenen Kartoffellinien DL4 und DL12 (Düring und Mahn, 1999; P. Porsch, A. Mahn und K. Düring, unveröffentlicht) zurückgegriffen, die das Gen für T4-Lysozym unter der Kontrolle des 35S Promotors tragen. Außerdem konnte die entsprechende Lysozym-Sonde einfach hergestellt werden. Blätter dieser Linien wurden 8 h lang aerob und anaerob inkubiert, Gesamt-RNA wurde extrahiert und auf einem denaturierenden Agarosegel mit Formaldehyd aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Membran geblottet und mit einer DIG-markierten „Antisense“ RNA Sonde gegen Lysozym detektiert.

Nach 8-stündiger anaerober Inkubation zeigte sich, daß bei der Linie DL12 ein deutlicher Rückgang der Menge an Lysozym-mRNA festgestellt werden konnte, und bei der Linie DL4 überhaupt keine Lysozym-mRNA mehr detektierbar war (Abb. 2). Mit einem Bild des Gels unter UV-Licht nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde dokumentiert, daß gleiche Mengen an Gesamt-RNA in allen Spuren des Agarosegels aufgetragen waren (nicht gezeigt).

Folglich ist der als konstitutiv geltende CaMV 35S Promotor unter aeroben Bedingungen zwar aktiv, unter anaeroben Bedingungen wird die Transkription jedoch bereits nach 8 h

abgeschaltet. Somit ist eine gezielte Proteinsynthese unter Anaerobiose mit dem 35S Promotor in der Kartoffel nicht zu erwarten.

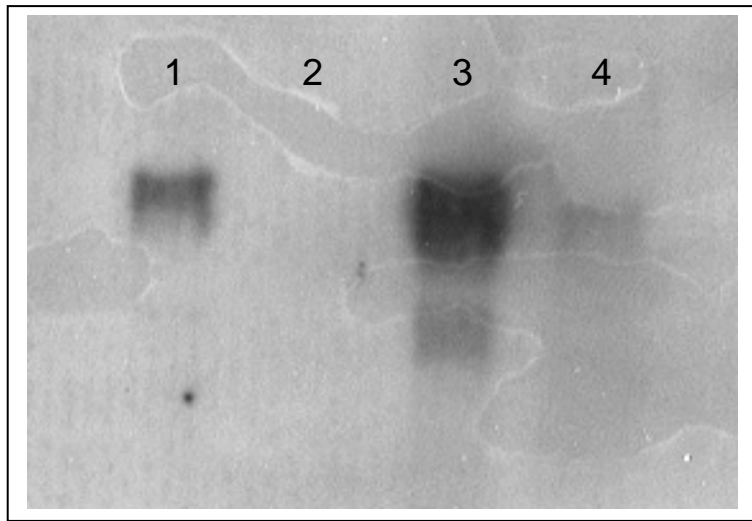


Abb. 2: Aktivität des 35S Promotors bei Anaerobiose

Autoradiogramm eines Northern Blots nach Hybridisierung mit einer Lysozymsonde. Aufgetragen wurden je 20 µg Gesamt-RNA von Blättern der 35S-Lysozym Kartoffelpflanzen DL4 und DL12 nach 8-stündiger aerober und anaerober Inkubation und. Spur 1: DL4 aerob, Spur 2: DL4 anaerob, Spur 3: DL12 aerob, Spur 4: DL12 anaerob

3.2 Kartoffeltransformation mit den GUS-Konstrukten und Kontrollplasmiden

Kartoffeln der Sorte Désirée wurden mittels „Leaf Disc“ Technik und *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Zur Untersuchung des Verhaltens des *GapC4* Promotors in der Kartoffel wurden dafür 4 verschiedene Konstrukte verwendet. Alle Konstrukte tragen neben den verschiedenen Promotor-GUS-Kombinationen das *nptII*-Gen als Selektionsmarker für die Transformationsereignisse, um den regenerierenden Pflanzen Resistenz gegen Kanamycin zu vermitteln (siehe 2.2.7, Abb. 1).

Konstrukt 1 trägt auf dem binären Vektor das GUS-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors. Die mit diesem Konstrukt transformierten Pflanzen dienen als Positivkontrolle, denn dieser Promotor ist unter aeroben Bedingungen in der Kartoffel aktiv. Außerdem kann die Expressionsstärke des *GapC4* Promotors mit der des 35S Promotors, der als starker Pflanzenpromotor gilt, verglichen werden. Nach erfolgreicher Transformation wurden 8 unabhängige transgene Linien für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die mit diesem Konstrukt transformierten Kartoffellinien tragen die Bezeichnungen 1-1 bis 1-8.

Der binäre Vektor mit dem Konstrukt 2 trägt das Gen für β -Glucuronidase, der von dem *GapC4* Promotor kontrolliert wird. Mit diesem Konstrukt transformierte Kartoffelpflanzen wurden für die Untersuchungen zum Verhalten des *GapC4* Promotors in der Kartoffel eingesetzt. Bei der Transformation mit diesem Konstrukt konnten 22 unabhängige Transformanten regeneriert werden. Sie tragen die Bezeichnungen 2-1 bis 2-22.

Konstrukt 3 beinhaltet das GUS-Gen ohne vorgeschalteten Promotor. Damit transformierte Pflanzen sind Kontrollen, um ausschließen zu können, daß eine eventuelle Expression der β -Glucuronidase auf Sequenzen zurückzuführen sind, die sich auf dem binären Vektor befinden. Falls sich bei diesen Pflanzen keine Expression zeigt, ist sichergestellt, daß ausschließlich der Promotor für die Synthese des Reportergens verantwortlich ist. Für die Versuche wurden 6 unabhängige Linien, die mit 3-1 bis 3-6 gekennzeichnet sind, eingesetzt.

Konstrukt 4, das lediglich den binären Vektor beinhaltet, stellt die transgene Kontrolle dar. Dort befindet sich nur der Selektionsmarker *nptII* auf der T-DNA. Nach der Transformation wurden 6 unabhängige transgene Kartoffelpflanzen, die die Bezeichnungen 4-1 bis 4-6 tragen, selektiert.

Alle transgenen Linien wurden zunächst in Sterilkultur vermehrt, auf persistierende Agrobakterien getestet und zur Knollenproduktion im Gewächshaus ausgepflanzt. Nicht transgene Kontrollpflanzen der Sorte Désirée wurden ebenfalls in vitro vermehrt und unter gleichen Bedingungen ausgepflanzt.

3.3 Histochemischer GUS-Test mit Blättern, Stengeln und Wurzeln nach anaerober Inkubation

Blätter, Stengel und Wurzeln der regenerierten transgenen Linien 2-1 bis 2-22 wurden 40 h lang aerob und anaerob inkubiert. Danach wurde ein histochemischer GUS-Test durchgeführt. Indikator für die Aktivität der β -Glucuronidase ist die Blaufärbung des Gewebes bedingt durch die Umsetzung des farblosen X-Gluc zu einem blauen Farbstoff. Um die Färbung besser sichtbar zu machen, wurde das Chlorophyll aus Blättern und Stengeln mittels Ethanol extrahiert.

Der Großteil der *GapC4*-GUS Linien zeigte eine anaerobe Induzierbarkeit des GUS-Gens. Von 22 getesteten Linien wurden 16 sehr stark und 5 stark durch Anaerobiose induziert (Tabelle 1). Lediglich eine Linie, 2-2, zeigte keine GUS-Expression, weder unter anaeroben noch unter

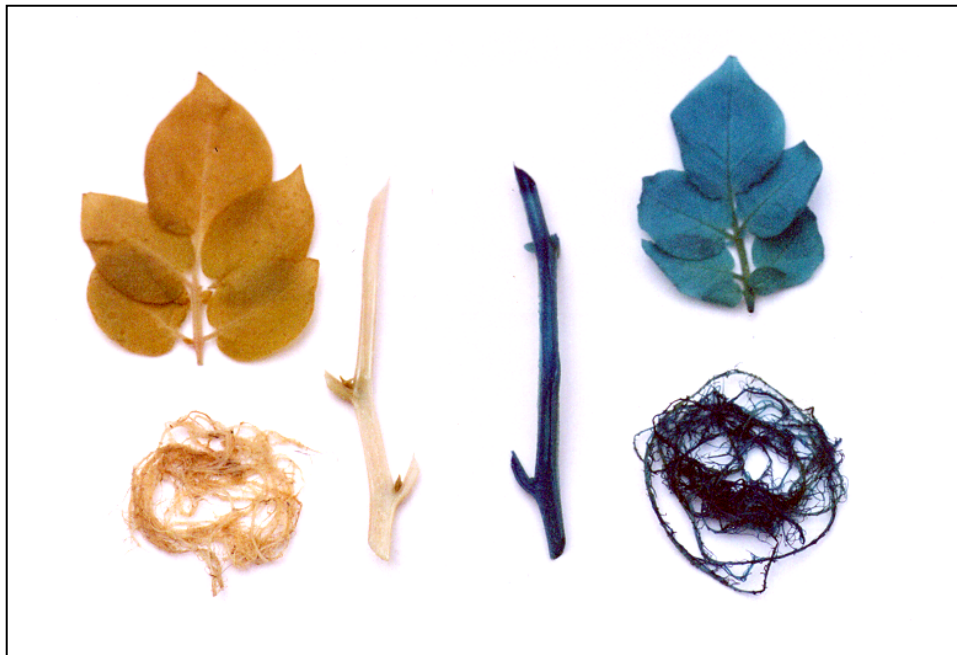


Abb. 3: Anaerobe Promotorinduktion in Kartoffelpflanzen

Blätter, Stengel und Wurzeln der histochemisch angefärbten *GapC4*-GUS Linie 2-6 nach 40-stündiger aerober (links) und anaerober (rechts) Inkubation. Das Chlorophyll wurde zur besseren Sichtbarmachung der Färbung extrahiert.

aeroben Bedingungen. Bei den restlichen 21 Linien ergaben sich unter aeroben Bedingungen bei 13 Linien keine und bei 7 Linien schwache Signale, lediglich Linie 2-3 zeigte eine starke Blaufärbung (Tabelle 1). Eine gewebespezifische Expression konnte nicht festgestellt werden. Die anaerobe Induzierbarkeit wurde in Blättern, Stengeln und Wurzeln beobachtet (Abb. 3 und nicht gezeigt).

Die Pflanzen, die das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des 35S Promotors tragen, zeigten wie erwartet unter aeroben Bedingungen starke Signale in Blättern, Stengeln und Wurzeln. Auch nach anaerober Inkubation wurde in diesen Geweben eine starke Blaufärbung festgestellt. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, daß die Synthese unter anaeroben Bedingungen fortbesteht, denn unter 3.1 wurde gezeigt, daß der 35S Promotor nach 8-stündiger Anaerobiose nicht mehr aktiv ist. Die Signale können auf die hohe Stabilität des Enzyms im Pflanzengewebe zurückgeführt werden. Die einzige Ausnahme war Linie 1-2, die weder aerob noch anaerob Signale zeigte (Tabelle 1).

Die nicht transgenen Pflanzen sowie die mit Konstrukt 3 und 4 transformierten Kontrollen wiesen weder nach aerober noch anaerober Inkubation eine Blaufärbung auf (Tabelle 1). Das bedeutet, daß die Expression der β -Glucuronidase ausschließlich von der Anwesenheit eines

Promotors abhängt, und nicht auf mittransformierte Sequenzen des binären Vektors zurückzuführen ist.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zum histochemischen GUS-Test mit Blättern nach aerober und anaerober Inkubation in der Übersicht dargestellt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der *GapC4* Promotor in Kartoffel effizient anaerob induziert wird.

Tabelle 1: Histochemisch untersuchte transgene Kartoffellinien nach 40stündiger aerober und anaerober Inkubation.

Differenzierung der relativen Expressionsstärke nach visueller Auswertung angefärbter Blätter. -: keine Expression, +: schwache Expression, ++: starke Expression, +++: sehr starke Expression.

Konstrukt 1 35S-GUS			Konstrukt 2 <i>GapC4</i> -GUS			Konstrukt 3 promotorlos-GUS			Konstrukt 4 ohne GUS		
Linie	GUS + anaerob	GUS + aerob	Linie	GUS + anaerob	GUS + aerob	Linie	GUS + anaerob	GUS + Aerob	Linie	GUS + anaerob	GUS + aerob
1-1	+++	+++	2-1	+++	-	3-1	-	-	4-1	-	-
1-2	-	-	2-2	-	-	3-2	-	-	4-2	-	-
1-3	+++	+++	2-3	+++	++	3-3	-	-	4-3	-	-
1-4	+++	+++	2-4	++	-	3-4	-	-	4-4	-	-
1-5	+++	+++	2-5	++	-	3-5	-	-	4-5	-	-
1-6	+++	+++	2-6	+++	+	3-6	-	-	4-6	-	-
1-7	+++	+++	2-7	++	-						
1-8	+++	+++	2-8	+++	+						
			2-9	++	+						
			2-10	+++	-						
			2-11	+++	-						
			2-12	+++	-						
			2-13	+++	+						
			2-14	+++	+						
			2-15	+++	-						
			2-16	+++	-						
			2-17	+++	+						
			2-18	+++	-						
			2-19	+++	+						
			2-20	+++	-						
			2-21	+++	-						
			2-22	++	-						

3.4 Histochemischer GUS-Test mit Knollenscheiben nach anaerober Inkubation

Gewächshausknollen der transgenen Linien wurden oberflächensterilisiert, in Scheiben geschnitten und 40 h lang aerob sowie anaerob inkubiert. Vor der histochemischen Anfärbung wurden mit einem Skalpell Dünnschnitte der Knollenscheiben angefertigt, um das Eindringen der Färbelösung während der Vakuuminfiltration zu erleichtern. 21 von 22 untersuchten

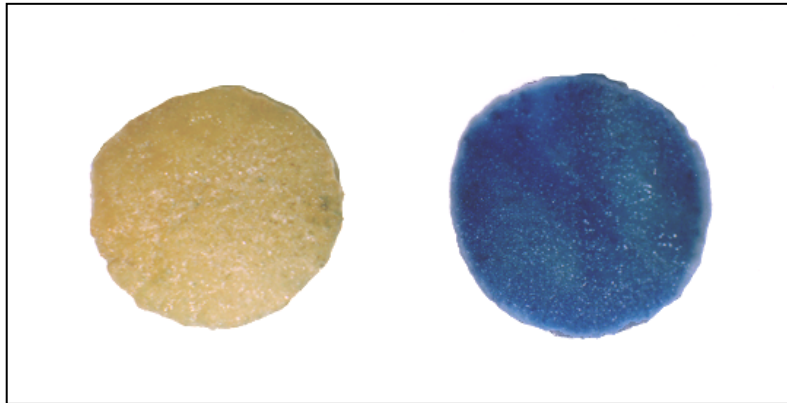


Abb. 4: Anaerobe Promotorinduktion in Knollen

Knollenscheiben der histochemisch angefärbten *GapC4*-GUS Linie 2-6 nach 40-stündiger aerober (links) und anaerober (rechts) Inkubation.

GapC4-GUS Linien zeigten nach Anaerobiose starke Signale, während nach aerober Inkubation keine Promotorinduktion festgestellt wurde (Abb. 4 und nicht gezeigt). Lediglich die Knollenscheiben der Linie 2-2 konnten weder aerob noch anaerob angefärbt werden (nicht gezeigt).

Die Knollenscheiben der Kontrollpflanzen wurden ebenfalls getestet. Die Linien 1-1 bis 1-8 konnten bis auf Linie 1-2 nach aerober und anaerober Inkubation blau gefärbt werden. Die Linie 1-2 zeigte in keinem Fall Signale. Alle Linien, die mit Konstrukt 3 und 4 transformiert worden waren, sowie die nicht transgene Kontrolle zeigten weder aerob noch anaerob Expression der β -Glucuronidase in Knollen (nicht gezeigt). Damit zeigten die Knollen der einzelnen Linien das gleiche Verhalten, welches bereits in Blättern, Stengeln und Wurzeln dieser Linien beobachtet wurde.

3.5 Histochemischer GUS-Test mit Knollenscheiben nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

Um zu überprüfen, ob der *GapC4* Promotor durch eine Infektion mit *Erwinia* in Knollen induziert wird, wurden sterile Knollenscheiben der transgenen Linien mit *Erwinia carotovora*

infiziert. Nach 40-stündiger Inkubation waren die Knollenscheiben vollständig mazeriert. Daraufhin wurde das Gewebe histochemisch angefärbt.

Von den 22 untersuchten *GapC4*-GUS Knollen zeigten alle Linien bis auf 2-2 nach der Infektion mit *Erwinia* eine starke Induktion. Auch die Kontrollen verhielten sich wie bereits nach anaerober Inkubation beobachtet. Die Linien, die das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des 35S Promotors trugen, wurden blau angefärbt. Die Ausnahme bildete wieder Linie 1-2, die keine Signale aufwies. Die mit den Konstrukten 3 und 4 transformierten Knollenscheiben zeigten keine Expression des Reportergens. Auch bei der nicht transgenen Kontrolle, die mit *Erwinia* infiziert worden war, wurde keine Blaufärbung festgestellt (nicht

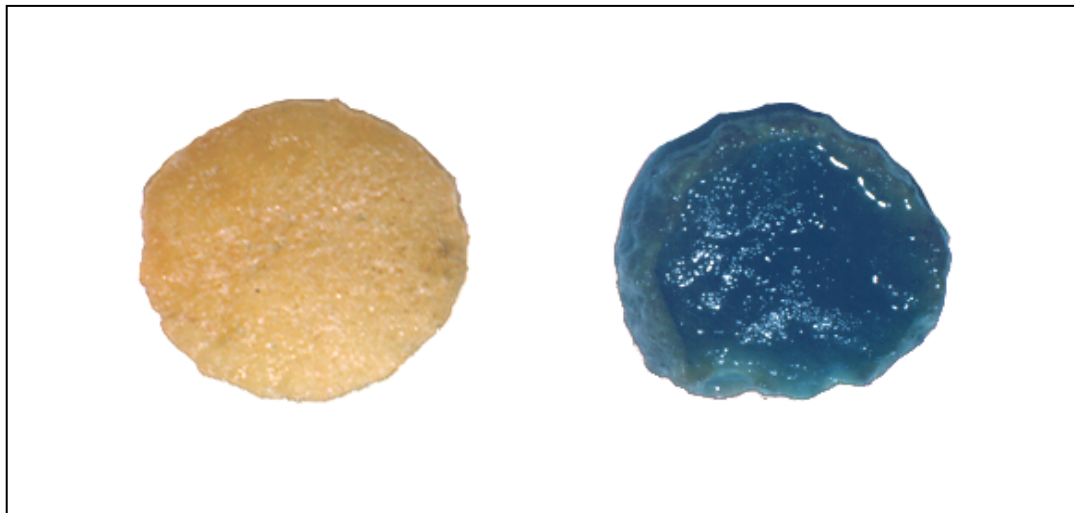


Abb. 5: Induktion des *GapC4* Promotors durch *Erwinia*-Infektion

Knollenscheiben der histochemisch angefärbten *GapC4*-GUS Linie 2-6 ohne Infektion (links) und nach Infektion mit *Erwinia carotovora* (rechts).

gezeigt). Das bedeutet, daß weder durch die Bakterien noch durch die Knolle ein Hintergrundsignal hervorgerufen wird.

Um zu untersuchen, ob die Induktion des *GapC4* Promotors durch einen möglichen Mangel an Sauerstoff in der für diesen Test verwendeten Box begründet ist, wurde der Versuchsaufbau gemäß 2.10 modifiziert und der Knollenscheibentest unter einem ständigen sterilen Luftstrom durchgeführt. Das Induktionsverhalten des *GapC4* Promotors in den infizierten Knollenscheiben änderte sich dadurch nicht. Nach 40-stündiger Inkubation waren die Knollenscheiben vollständig mazeriert. Die Linien 2-1 bis 2-22 zeigten beim histochemischen GUS-Test starke Signale (Abb. 5 und nicht gezeigt). Lediglich die Linie 2-2 wurde nicht blau gefärbt. Die 35S-GUS Knollen wiesen bis auf Linie 2-2 starke Signale auf. Auch die

Negativkontrollen verhielten sich wie bereits beobachtet, sie zeigten alle keine Expression (nicht gezeigt). Die Induzierbarkeit des *GapC4* Promotors in der Knolle nach Infektion durch *Erwinia* unter Bedingungen, die den Mangel an Sauerstoff ausschließen, wies darauf hin, daß die Induktion spezifisch durch die bakterielle Infektion verursacht wurde.

3.6 Fluorimetrische GUS-Tests

Die Aktivität der β -Glucuronidase kann bestimmt werden, indem man anstelle von X-Gluc als Substrat MUG verwendet, das enzymatisch in MU umgewandelt wird. MU fluoresziert und kann mit einem Fluorimeter quantifiziert werden. Die enzymatische Aktivität ist durch die Relation der entstandenen Menge MU zur Zeit bestimmt. Aus Blättern und Knollen wurden Proteinextrakte nach aerober und anaerober Inkubation sowie aus Knollen nach Infektion mit *Erwinia* gewonnen. Anschließend wurde die Aktivität der β -Glucuronidase fluorimetrisch durch Zugabe von MUG ermittelt.

14 *GapC4*-GUS Linien wurden analysiert. Die GUS-Aktivitäten für Blätter nach anaerober Inkubation reichten von 23 bis 143 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein (Tabelle 2). Der Durchschnitt der Werte betrug 68,8 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein. Unter aeroben Bedingungen bewegte sich die GUS-Aktivität zwischen 0,10 und 0,77 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein. Verglichen mit den Kontrollen 3-1, 3-2, 4-5 und nicht transgenen Blättern (Tabelle 2) waren dies keine signifikanten Werte und stellen somit Hintergrundaktivität dar. Die gemessenen Werte für aerobe Inkubation in Blättern, die das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des 35S Promotors tragen, lagen bei 4 getesteten Linien zwischen 721 und 1069 mit einem Durchschnitt von 692 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein (Tabelle 2). Unter anaeroben Bedingungen wiesen diese Pflanzen ebenfalls hohe GUS-Aktivitäten auf, was in der hohen Stabilität der β -Glucuronidase begründet ist. Vergleicht man diese Werte mit denen für die *GapC4*-GUS Blätter unter anaeroben Bedingungen, so ist festzustellen, daß in 2 *GapC4*-GUS Linien der *GapC4* Promotor etwa 20% der Expressionstärke des 35S Promotors erreicht. Die 14 getesteten *GapC4*-GUS Linien lagen bezüglich der Höhe der GUS-Expression unter anaeroben Bedingungen bei durchschnittlich 10% verglichen mit dem 35S Promotor-Konstrukten. Zum Vergleich wurden Blätter der transgenen Tabaklinien pRT99 und 404-8 getestet. Bei pRT99 handelt es sich um transgenen Tabak mit einem Konstrukt, bei dem der 35S Promotor das GUS-Gen steuert, bei 404-8 um eine Linie, bei der das Gen für β -

Glucuronidase vom *GapC4* Promotor gesteuert wird (Köhler et al., 1996). Dabei zeigte der *GapC4* Promotor nach anaerober Inkubation in Kartoffelblättern im Schnitt etwa 25% der Aktivität verglichen mit der Expression in Tabak (Tabelle 2). In der Linie 2-19 erreichte der *GapC4* Promotor in der Kartoffel unter anaeroben Bedingungen 56% der Stärke im Vergleich zu Tabakblättern der Linie 404-8. Im Gegensatz dazu exprimiert der 35S Promotor in Tabakblättern schwächer als in Blättern der Kartoffel (Tabelle 2).

Tabelle 2: Fluorimetrisch bestimmte GUS-Aktivitäten in Blättern und Knollen

GUS-Aktivitäten unabhängiger transgener Linien nach 40-stündiger aerober und anaerober Inkubation sowie nach vollständiger Mazeration durch *Erwinia carotovora*.

Desi: nicht transgene Kontrolle, pRT99: Transgener Tabak mit 35S-GUS-Konstrukt, 404-8: Transgener Tabak mit *GapC4*-GUS-Konstrukt, n. g.: nicht gemessen, n. a.: nicht anwendbar

Aktivität in pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein					
	Blätter		Knollen		
Linie	aerob	anaerob	aerob	anaerob	mazertiert
1-5	1069,00	1329,37	783,04	966,84	174,34
1-6	259,55	110,02	114,11	155,12	87,55
1-7	721,15	918,00	246,70	209,65	62,08
1-8	721,89	1573,00	n. g.	n. g.	n. g.
2-8	0,77	111,03	0,67	18,25	6,92
2-10	0,24	79,14	0,99	45,77	5,57
2-11	0,36	48,62	0,28	7,32	3,80
2-12	0,67	60,61	0,45	35,35	7,89
2-13	0,61	131,69	0,32	10,25	31,65
2-14	0,16	75,51	0,50	32,77	32,40
2-15	0,15	45,55	0,93	39,75	11,77
2-16	0,10	23,97	0,65	14,61	14,20
2-17	0,24	65,49	1,14	59,43	35,13
2-18	0,16	56,74	0,54	13,20	10,46
2-19	0,13	143,52	1,03	14,97	21,46
2-20	0,24	42,55	2,10	41,07	10,37
2-21	0,11	42,77	1,12	61,02	8,01
2-22	0,47	35,93	0,32	9,59	8,87
3-1	4,16	0,68	0,66	0,30	1,38
3-2	0,68	0,07	0,00	0,25	0,36
4-5	5,34	0,58	0,00	0,35	0,50
Desi	0,19	0,34	0,00	0,52	1,45
Tabak pRT99	47,41	90,19	n. a.	n. a.	n. a.
Tabak 404-8	0,90	255,29	n. a.	n. a.	n. a.

Bei den 14 untersuchten *GapC4*-GUS Linien reichten die GUS-Aktivitäten in Knollen nach anaerober Inkubation von 7,32 bis 61,02 pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein (Tabelle 2 und Abb. 6). Im Schnitt betrug die Aktivität 28,7 pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein. Die Knollen zeigten unter aeroben Bedingungen Werte von durchschnittlich 0,8 pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein, womit diese verglichen mit den Aktivitäten der Kontrollen leicht über dem Hintergrundsignal lagen (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu zeigten Knollen mit dem 35S-GUS Konstrukt unter aeroben Bedingungen hohe Aktivitäten von durchschnittlich 381,3 pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein (Tabelle 2). Auch nach anaerober Inkubation wurden in diesen Knollen hohe Werte gemessen, was wiederum auf die schon beschriebene hohe Stabilität der β -Glucuronidase zurückzuführen ist. Die *GapC4*-GUS Knollen zeigten nach anaerober Inkubation im Schnitt 7,5% der Aktivität verglichen mit der der 35S-GUS Knollen unter aeroben Bedingungen, bei den zwei Linien 2-17 und 2-21 erreichte der *GapC4* Promotor rund 15% der Expressionsstärke des 35S Promotors.

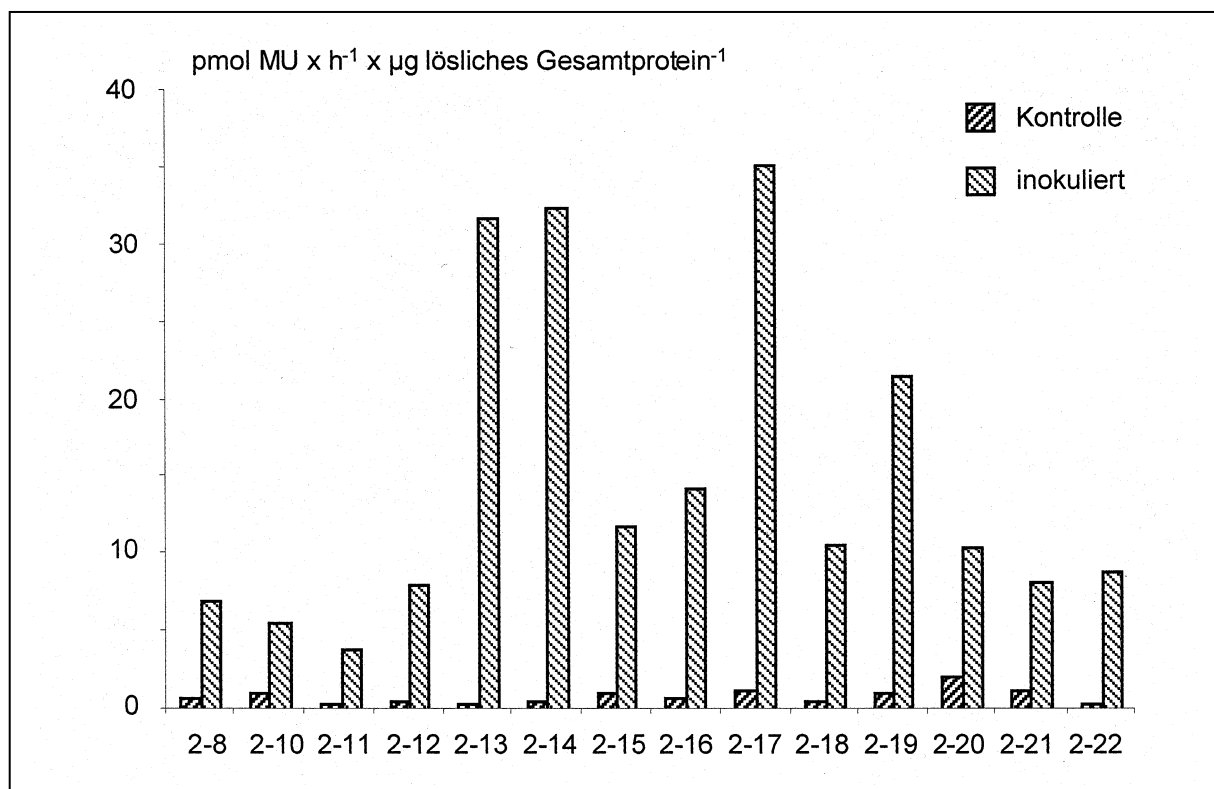


Abb. 6: Induktion des *GapC4* Promotors nach Mazeration durch *Erwinia carotovora*

Fluorimetrisch ermittelte β -Glucuronidase-Aktivitäten in *GapC4*-GUS Knollenscheiben nach Infektion mit *Erwinia carotovora* und vollständiger Mazeration des Gewebes (jeweils rechts) und in nicht infizierten *GapC4*-GUS Knollenscheiben (jeweils links)

Die Aktivitäten der β -Glucuronidase in Knollenscheiben nach Infektion mit *Erwinia carotovora* wurden ebenfalls ermittelt. Nach einer Inkubationsdauer von 40 h wurden die dann vollständig mazerierten Knollenscheiben fluorimetrisch analysiert. Für die 22 untersuchten *GapC4*-GUS Linien lagen die Werte zwischen 3,80 und 35,13 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein (Tabelle 2, Abb. 6). Der Durchschnitt der Aktivitäten lag bei 14,9 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein und betrug somit etwa 50% verglichen mit Knollen nach anaerober Inkubation. Im Vergleich zu den aeroben 35S-GUS Knollenscheiben lag die Expressionsstärke der *GapC4*-GUS Knollen nach *Erwinia*-Infektion im Schnitt bei ca. 3,9%, wobei die zwei Linien 2-17 und 2-14 mit über 8% herausragten.

Aus den Werten in Tabelle 2 wurden die Induktionsfaktoren für die einzelnen *GapC4*-GUS Linien berechnet. Es ergaben sich für anaerobe Induktion in Blättern Faktoren von 76 bis 1104 und im Schnitt 308 verglichen mit Blättern nach aerober Inkubation (Tabelle 3).

Tabelle 3: Induktionsfaktoren des *GapC4* Promotors in Kartoffel

Induktionsfaktoren relativ zu den Hintergrundsignalen unabhängiger transgener *GapC4*-GUS Linien nach 40-stündiger anaerober Inkubation und nach vollständiger Mazeration durch *Erwinia carotovora*. Zur Berechnung der Faktoren wurden die absoluten Werte aus Tabelle 2 verwendet.

Induktionsfaktoren			
	Blätter	Knollen	
Linie	anaerob	anaerob	mazeriert
2-8	144,2	27,2	10,3
2-10	329,8	46,2	5,6
2-11	135,1	26,1	13,6
2-12	90,5	74,1	17,5
2-13	215,9	32,0	98,9
2-14	471,9	65,5	64,8
2-15	303,7	42,7	12,7
2-16	239,7	22,5	21,8
2-17	272,9	52,1	30,8
2-18	354,6	24,4	19,4
2-19	1104,0	14,5	20,8
2-20	177,3	19,6	4,9
2-21	388,8	54,5	7,2
2-22	76,4	30,0	27,7
Durchschnitt	307,5	38,0	25,4

In Knollen wurde eine durchschnittlich 38-fache anaerobe Induktion des *GapC4* Promotors im Vergleich mit den aeroben Knollen erzielt. Dabei lag der höchste Wert bei 74-facher Induktion. Nach Mazeration der Knollenscheiben durch *Erwinia* wurde im Mittel eine 25-fache Induktion des Promotors errechnet. Hierbei reichten die Werte der Induktionsfaktoren von 4,9 bis 98,9 verglichen mit nicht mazerierten Knollenscheiben.

3.7 Teilweise Mazeration von Knollenscheiben

Nachdem gezeigt worden war, daß der *GapC4* Promotor in Knollen durch die Infektion mit *Erwinia* induziert werden konnte, wurde untersucht, ob sich die Induktion des Promotors auf den mazerierten Teil des Knollengewebes beschränkt, oder ob auch in angrenzendem intakten Gewebe Promotorinduktion nachgewiesen werden konnte. Um dies zu überprüfen, wurden transgene *GapC4*-GUS Knollen der Linien 2-13 und 2-17 partiell mazeriert. Große Knollenscheiben wurden in der Mitte verwundet und mit *Erwinia* infiziert. Nach 24 h war ein Bereich von etwa 1,5 cm Durchmesser um die Verwundungsstelle herum mazeriert. Dieses Gewebe wurde von dem intakten Teil der Knollenscheibe abgetrennt. Übrig blieb ein fester und nicht mazerierter Ring.

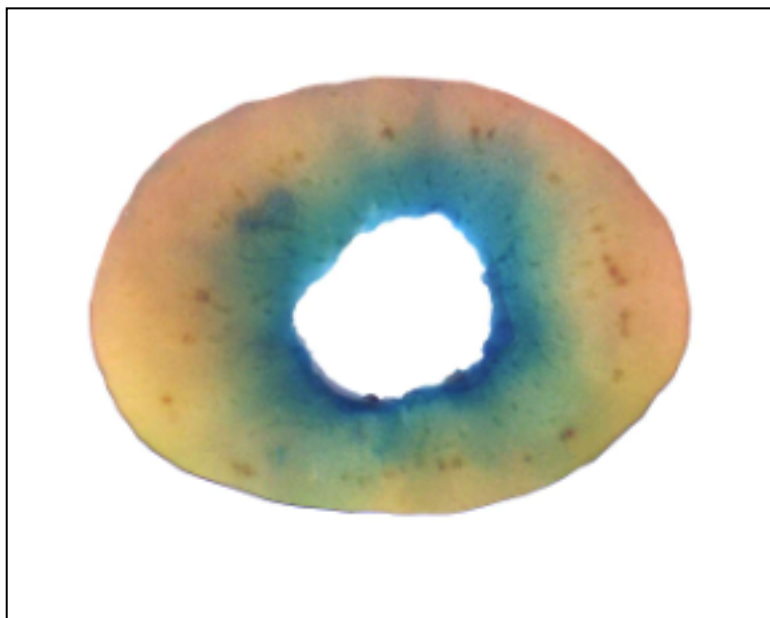


Abb. 7: Teilweise mazerierte Knollenscheibe

Histochemisch angefärbte *GapC4*-GUS Knollenscheibe der Linie 2-17 nach teilweiser Infektion durch *Erwinia carotovora* und Entnahme des mazerierten Gewebes

Dieser Ring wurde histochemisch angefärbt. Um zu gewährleisten, daß der Färbepuffer in das feste Gewebe eindringen konnte, wurden etwa 1 mm starke Dünnschnitte der Ringe angefertigt. Dies diente auch als Kontrolle dafür, daß es sich tatsächlich um festes und somit intaktes Gewebe handelte, denn aus mazeriertem Gewebe ließen sich keine dünnen Scheiben mehr schneiden. Zur Färbung wurde ein modifizierter Puffer verwendet, der zur besseren Penetration des festen Knollengewebes Triton X-100 enthielt. Außerdem wurde dem Puffer Streptomycin zugegeben, um weiteres Wachstum von eventuell anhaftenden *Erwinia*-Bakterien während der Inkubation in dem Färbepuffer zu verhindern. Unmittelbar um den mazerierten Bereich herum konnte in den beiden untersuchten Linien eine starke Blaufärbung festgestellt werden, und in einer Entfernung von bis zu etwa 15 mm konnte das Gewebe noch leicht blau angefärbt werden. Lediglich in den äußersten Bereichen der Knollenscheibe konnte keine Promotorinduktion nachgewiesen werden (Abb. 7).

Um die Promotorinduktion in intaktem Gewebe nach teilweiser Mazeration zu quantifizieren, wurden weitere Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17 mit *Erwinia carotovora* infiziert und 24 h bis zur partiellen Mazeration inkubiert. Das weiche Gewebe wurde durch gründliches Herausschälen entfernt. Danach wurden in Abständen von 0 bis 2 mm, 2 bis 4 mm sowie 20 mm, gemessen von der Grenze zwischen mazeriertem und intaktem Gewebe zum Äußeren der Knollenscheibe hin, Proben genommen und fluorimetrisch auf β -Glucuronidase-Aktivität hin analysiert. Außerdem wurde zur Kontrolle die Aktivität im mazerierten Gewebe aus dem Inneren der Knollenscheibe gemessen. Als weitere Kontrollen dienten aerob inkubierte Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17. In partiell mazerierten Knollenscheiben der Linie 2-13 wurde in einem Abstand von 0 bis 2 mm von der Mazerationsgrenze entfernt eine Aktivität von 29,03 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein gemessen. In einer Entfernung von 2 bis 4 mm betrug sie 20,26 und bei 20 mm Entfernung 12,99 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein. Die Expressionsstärke im mazerierten Gewebe nach 24-stündiger Inokulation betrug 41,55 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein (Tabelle 4 und Abb. 8). Verglichen mit diesem Wert wurde somit bei 0 bis 2 mm Abstand noch etwa 70% Aktivität erreicht, für die Entfernung von 2 bis 4 mm wurde ein Wert von etwa 49% errechnet, und 31% betrug die relative Expressionsstärke in einer Entfernung von 20 mm verglichen mit mazeriertem Gewebe. Bei der aeroben Kontrolle wurde lediglich ein Wert von 0,19 pmol MU/h/ μ g lösliches

Gesamtprotein ermittelt, was als Hintergrundaktivität zu werten ist, vergleicht man dies mit den Werten der aeroben Kontrollen in den vorangegangenen Experimenten.

Tabelle 4: Fluorimetrisch bestimmte GUS-Aktivitäten in teilweise mazerierten Knollenscheiben

GUS-Aktivitäten in Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17 nach teilweiser Mazeration durch *Erwinia carotovora*. Die Abstände beziehen sich auf intaktes Gewebe gemessen von der Grenze zwischen mazeriertem und intaktem Gewebe. mazeriert: vollständig mazeriertes Gewebe. aerob: nicht infizierte Kontrolle

Aktivität in pmol MU/h/μg lösliches Gesamtprotein		
Abstand	Linie	
	2-13	2-17
mazeriert	41,55	15,66
0-2 mm	29,03	9,07
2-4 mm	20,26	3,21
20 mm	12,99	0,75
aerob	0,19	0,15

Die Quantifizierung der Expressionsstärke bei der Linie 2-17 bestätigte ebenfalls die Induktion des Promotors in intaktem Gewebe, das sich in Nachbarschaft zu infiziertem befindet. Hier wurde unmittelbar an mazeriertes Gewebe angrenzend in einer Entfernung von 0 bis 2 mm eine

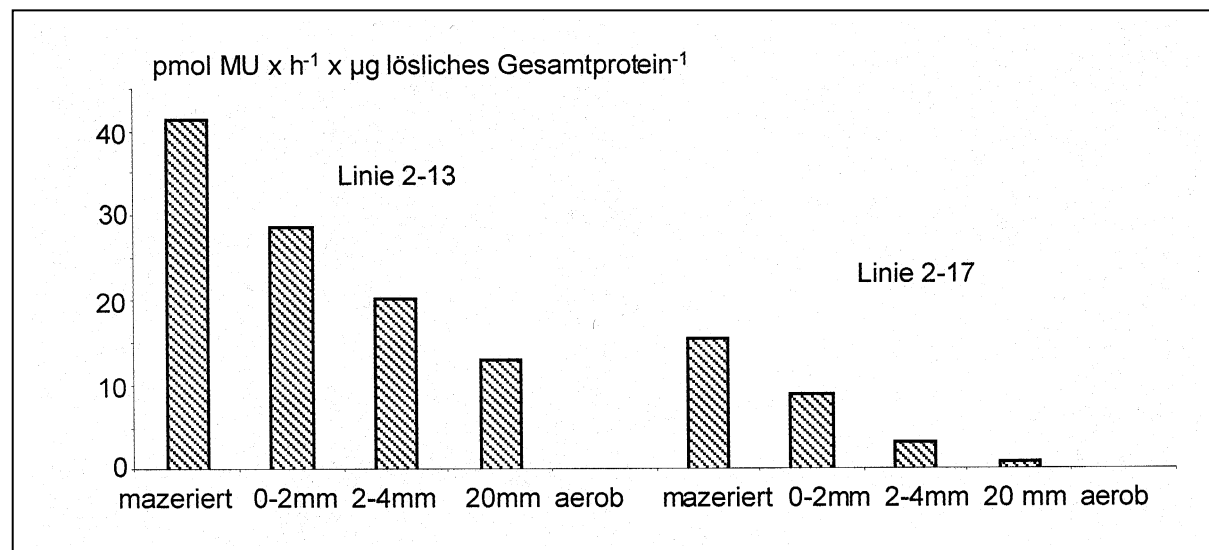


Abb. 8: Induktion des *GapC4* Promotors in intaktem Knollengewebe angrenzend an durch *Erwinia carotovora* mazeriertes Gewebe

Fluorimetrisch ermittelte β -Glucuronidase-Aktivitäten im intakten Gewebe von Knollenscheiben der *GapC4*-GUS Linien 2-13 und 2-17 nach teilweiser Mazeration durch *Erwinia carotovora* in verschiedenen Abständen von Übergang zum intakten Gewebe, im mazerierten Gewebe und in einer separaten nicht infizierten Knollenscheibe.

β -Glucuronidase-Aktivität von 9,07 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein festgestellt. Damit lag die Aktivität bei etwa 58% verglichen mit 15,66 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein in mazeriertem Gewebe nach 24-stündiger Inkubation mit *Erwinia*. In einem Abstand von 2 bis 4 mm betrug die Expressionsstärke noch 3,21 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein, was ca. 20% des Wertes für vollständig mazeriertes Gewebe entspricht, und bei 20 mm Entfernung wurde ein Wert von 0,75 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein ermittelt, also etwa 5% verglichen mit mazeriertem Gewebe (Tabelle 4 und Abb. 8). Auch bei der Linie 2-17 lag der Wert für die aerobe Kontrolle im Bereich der Hintergrundaktivität. In dem mazerierten Gewebe lag die Aktivität der β -Glucuronidase mit 15,66 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein niedriger als in dem Experiment mit vollständig mazerierten Knollen, wo eine Expression von 35,13 pmol MU/h/ μ g lösliches Gesamtprotein erreicht wurde. Es war jedoch zu bedenken, daß die Dauer der Mazeration mit 24 h geringer war als im vorangegangenen Versuch, bei dem mit 40 Stunden lang inkubiert worden war.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß der *GapC4* Promotor nach *Erwinia*-Infektion nicht nur im mazerierten Knollengewebe aktiv wurde, sondern daß sich die Induzierbarkeit auch auf das nicht befallene, intakte Gewebe hinaus erstreckt. Promotoraktivität wurde nach histochemischer Anfärbung der Knollenringe um die Infektionsstelle herum beobachtet, und durch Quantifizierung der Expressionsstärke konnte selbst noch in einem Abstand von 20 mm vom mazerierten Gewebe eine Induktion des *GapC4* Promotors festgestellt werden.

3.8 Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase

Zur Untersuchung des Diffusionsverhaltens der β -Glucuronidase im Knollengewebe wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, bei dem eine kleine transgene Knollenscheibe von einem nicht transgenen Ring umgeben war. Mit diesem Experiment sollte getestet werden, ob die Signale im intakten Gewebe rund um die Infektionsstelle durch Diffusion der β -Glucuronidase im Knollengewebe hervorgerufen wurden. Die Knollenscheibe wurde derart in den Ring eingepaßt, daß ein nahtloser Übergang von transgenem zu nicht transgenem Gewebe bestand, und somit Diffusion von einem zum anderen Gewebeteil möglich war. Die innere transgene Knollenscheibe der Linie 2-13 wurde in ihrer Mitte mit *Erwinia carotovora* infiziert und 24

Stunden lang inkubiert. Danach war lediglich der innere transgene Teil der Knollenscheibe mazeriert, während der äußere nicht transgene Ring noch nicht mazeriert war. Die beiden Gewebe wurden voneinander getrennt und separat histochemisch angefärbt. Dabei zeigte sich, daß lediglich die mazerierte innere Scheibe eine Blaufärbung aufwies, während im äußeren nicht transgenen Ring kein Signal detektierbar war (Abb. 9). Somit war ausgeschlossen, daß die in der transgenen Scheibe produzierte β -Glucuronidase in das intakte Knollengewebe diffundiert war. Das bedeutete folglich, daß die bei der teilweisen Mazeration festgestellte Blaufärbung des intakten Knollengewebes nicht auf Diffusion der β -Glucuronidase vom mazerierten in nicht mazeriertes Gewebe zurückzuführen war.



Abb. 9: Diffusionsverhalten der β -Glucuronidase in Knollenscheiben

Links: Histochemisch angefärbter transgener *GapC4*-GUS Kern der Linie 3-13 und nicht transgener Ring nach Mazeration des Kerns und Trennung der Gewebe. Rechts: Histochemisch angefärbter nicht transgener Kern und transgener *GapC4*-GUS Ring der Linie 3-13 nach Mazeration des Kerns und Trennung der Gewebe.

Im umgekehrten Versuchsaufbau, bei dem in einen Knollenscheibenring der Linie 2-13 eine nicht transgene Scheibe Knollengewebe eingepaßt wurde, sollte untersucht werden, ob durch die Mazeration des nicht transgenen Kerns eine Induktion im noch intakten transgenen Ring ausgelöst werden kann. Verwundet und infiziert wurde in der Mitte des nicht transgenen Kerns, und es wurde wiederum 24 h inkubiert, bis lediglich der Kern mazeriert, jedoch der äußere transgene Ring noch nicht infiziert war. Daraufhin wurden die Gewebe voneinander getrennt histochemisch analysiert. Der nicht transgene Kern der Knollenscheibe zeigte wie erwartet keine Blaufärbung, dagegen wies der äußere transgene Ring der Linie 2-13, der nicht

infiziert war, an seiner Innenseite einen etwa 3 bis 6 mm breiten blau gefärbten Bereich auf (Abb. 9). Dies wies darauf hin, daß entweder Bakterien in das intakte Knollengewebe eindringen, dieses jedoch noch nicht mazerierten, oder ein Signal aus den mit *Erwinia carotovora* infizierten Teilen der Knolle in das noch intakte Gewebe diffundierte, wodurch der *GapC4* Promotor induziert wurde.

3.9 Promotorinduktion durch *Erwinia*-Extrakte und aufgereinigte pektolytische Enzyme

Zur Überprüfung, ob lebende Bakterien zur Promotorinduktion in Knollen notwendig sind, wurde ein Knollenscheibentest mit transgenen *GapC4*-GUS Knollen durchgeführt, bei dem zur Inkubation sterilfiltrierte Extrakte aus *Erwinia*-Bakterien und aufgereinigte pektolytische Enzyme verwendet wurden.

Nicht transgene Knollenscheiben wurden mit *Erwinia* infiziert und homogenisiert. Von diesem Extrakt aus durch *Erwinia* mazerierten Knollen wurden jeweils 20 µl auf transgene Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17 gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 40 h waren die Knollenscheiben mazeriert, daraufhin wurden sie histochemisch angefärbt. Induktion des *GapC4* Promotors wurde durch Blaufärbung der Knollenscheiben nachgewiesen (Abb. 10). Aus einer *Erwinia*-Kultur, die in *Erwinia*-Medium herangezogen worden war, wurde ebenfalls

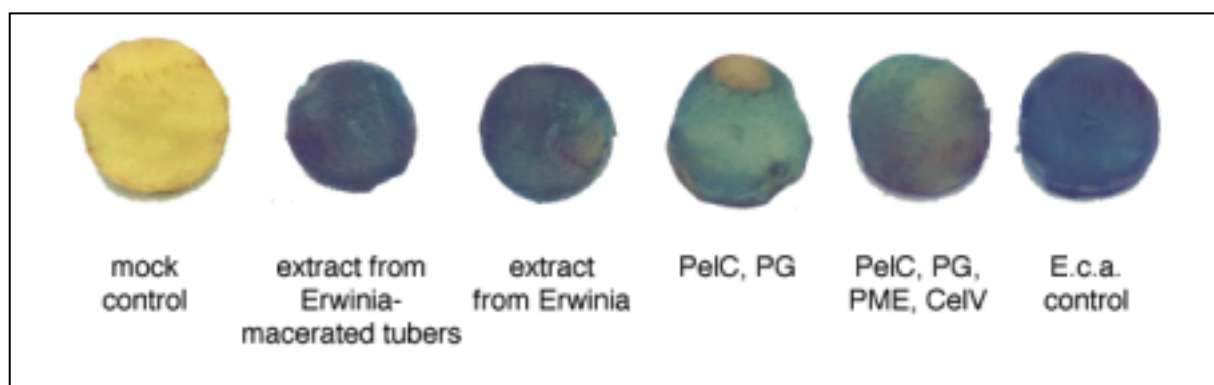


Abb. 10: Induktion des *GapC4* Promotors durch *Erwinia*-Extrakte und pektolytische Enzyme

Histochemisch angefärbte *GapC4*-GUS Knollenscheiben der Linie 2-17 nach Inkubation mit *Erwinia*-Medium, einem Extrakt aus durch *Erwinia* mazerierten Knollengewebe, einem *Erwinia*-Extrakt, einem Gemisch aus den pektolytischen *Erwinia*-Enzymen Pektatlyase und Polygalakturonase, einem Gemisch aus den *Erwinia*-Enzymen Pektatlyase, Polygalakturonase, Pektinmethylesterase und Cellulase, und nach Infektion mit *Erwinia carotovora*.

ein steriler Extrakt hergestellt. Jeweils 10 µl wurden pro Knollenscheibe für einen Test mit Knollen der Linien 2-13 und 2-17 verwendet. Nach 40 stündiger Inkubation waren die Knollenscheiben mazeriert. Im anschließenden histochemischen GUS Test wiesen sie eine deutlich Blaufärbung auf, somit wurde ebenfalls durch diesen Extrakt der *GapC4* Promotor in Knollen induziert (Abb. 10).

Auch in *Escherichia coli* überexprimierte *Erwinia*-Enzyme wurden zur Inkubation von *GapC4*-GUS Knollenscheiben verwendet. Eine Mischung, die aus jeweils 0,5 µg der *Erwinia*-Enzyme PelC, PG, PME und CelV bestand, wurde auf Knollenscheiben der Linien 2-13 und 2-17 gegeben. Nach 40 stündiger Inkubation waren die Knollenscheiben komplett mazeriert und wurden histochemisch angefärbt. Bei allen untersuchten Knollenscheiben wurde Blaufärbung und somit Promotorinduktion festgestellt (Abb. 10). Darüber hinaus wurde eine Kombination der *Erwinia*-Enzyme PelC und PG zur Inkubation der Knollenscheiben verwendet. Auch hierbei wurde nach einer Inkubationsdauer von 40 Stunden vollständige Mazeration der Knollenscheiben festgestellt. Promotorinduktion konnte durch die anschließende Anfärbung mit X-Gluc und die Blaufärbung der Knollenscheiben nachgewiesen werden (Abb. 10).

Zur Kontrolle wurden transgene Knollenscheiben mit *Erwinia*-Medium inokuliert. Nach der Inkubation über 40 Stunden war das Gewebe der Knollenscheiben noch fest und konnte wie erwartet nicht histochemisch angefärbt werden. Dagegen zeigte die Positivkontrolle, bei der Knollenscheiben mit lebenden Bakterien infiziert wurden, das erwartete Ergebnis: Das Knollengewebe war nach der Inkubation vollständig mazeriert, und die Knollenscheiben wiesen nach der histochemischen Anfärbung eine starke Blaufärbung auf (Abb. 10).

Bei einem weiteren Ansatz wurde getestet, ob die einzelnen *Erwinia*-Enzyme PelC, PG, PME und CelV in der Lage sind, den Promotor zu induzieren. Nach 40-stündiger Inkubation waren die Knollenscheiben, die mit PelC oder PG inokuliert worden waren, mazeriert. Bei der anschließenden histochemischen Anfärbung zeigte sich, daß der Promotor durch die Zugabe von PelC oder PG induziert wird (Abb. 11). Dagegen wurde das Knollengewebe weder durch PME noch CelV mazeriert, und nach histochemischer Anfärbung wurde keine Promotorinduktion nachgewiesen (Abb. 11).

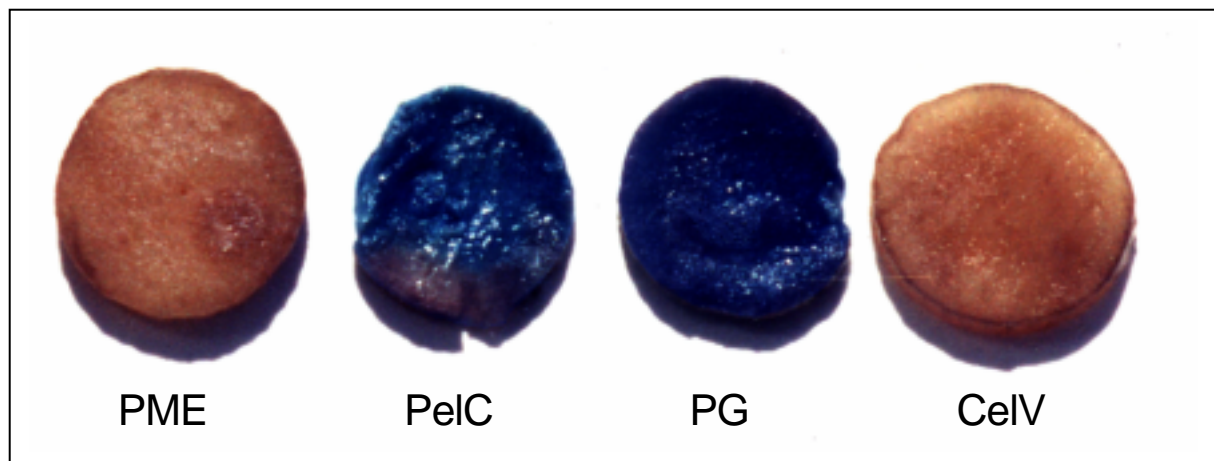


Abb. 11: Induktion des *GapC4* Promotors durch pektolytische Enzyme

Histochemisch angefärbte *GapC4*-GUS Knollenscheiben der Linie 2-17 nach Inkubation mit den pektolytischen *Erwinia*-Enzymen Pektinmethylesterase, Pektatlyase, Polygalakturonase und Cellulase.

Auffällig ist, daß die Induktion des *GapC4* Promotors in Kartoffelknollen immer mit der Mazeration des Gewebes einher geht. Lebende *Erwinia*-Bakterien, sterile *Erwinia*-Extrakte sowie die aufgereinigten pektolytischen Enzyme PelC und PG mazerieren das Knollengewebe und induzieren den Promotor. Andererseits findet bei der Inkubation mit PME oder CelV keine Mazeration statt, und auch der Promotor wird dabei nicht induziert. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei dem mobilen Faktor zur Promotorinduktion vermutlich um ein Signalmolekül handelt, das beim pektolytischen Abbau der pflanzlichen Zellwand entsteht oder freigesetzt wird.

3.10 Inaktivierung pektolytischer Enzyme

Für einen weiteren Knollenscheibentest wurden Oligogalakturonide aus Pektin und Polypektat durch partiellen pektolytischen Verdau hergestellt. Dazu wurde zunächst eine Methode zur Inaktivierung pektolytischer Enzyme entwickelt, um den kompletten Abbau zu Digalakturoniden zu verhindern und die Reaktionsansätze von aktiven pektolytischen Enzymen zu befreien. Die Inaktivierung pektolytischer Enzyme ist durch eine Behandlung der Enzyme mit Proteinase K möglich. Proteinase K läßt sich daraufhin durch Hitze vollständig inaktivieren.

Die Inaktivierung der pektolytischen Enzyme wurde experimentell durch eine Aktivitätsmessung der pektolytischen Enzyme nachgewiesen, indem bei einer Wellenlänge von 234 nm die Freisetzung von Oligogalakturoniden verfolgt wurde. Zunächst wurde der in 3.9

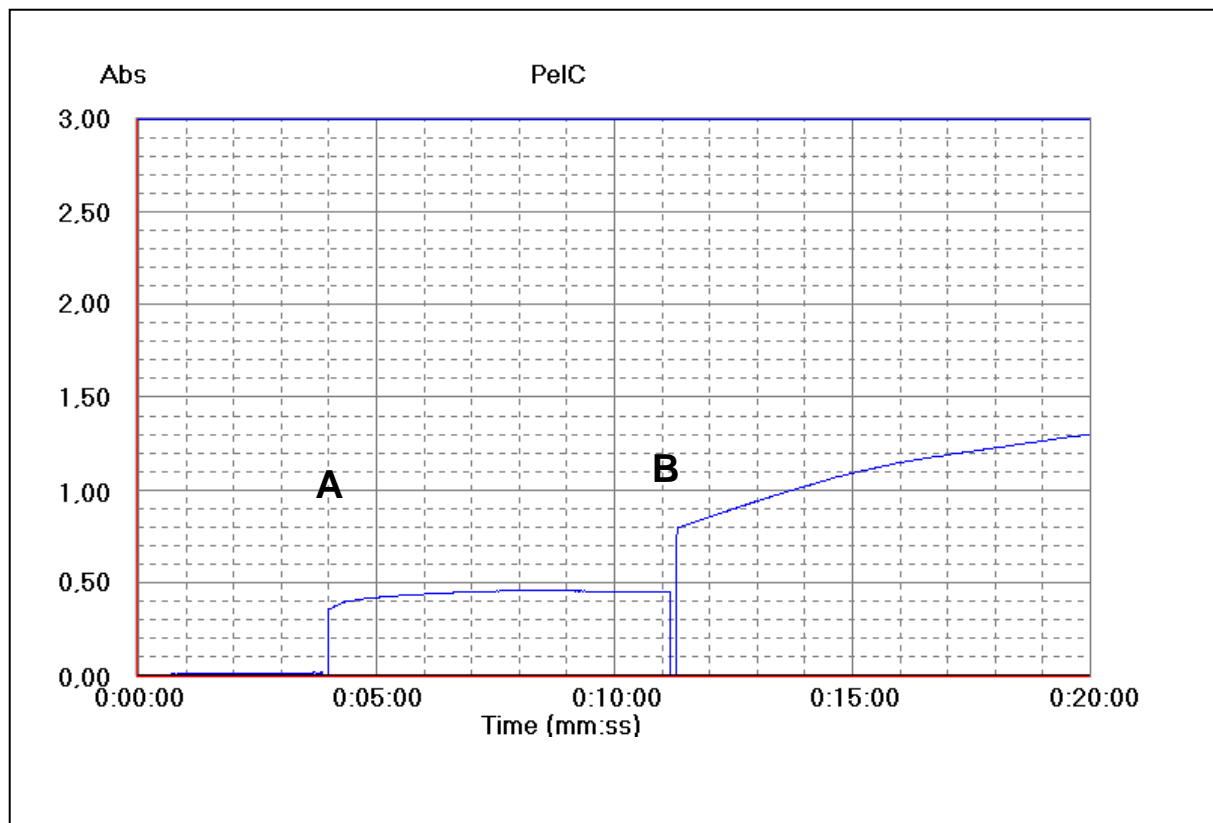


Abb. 12: Inaktivierung pektolytischer Enzyme eines *Erwinia*-Extrakts

Absorptionskinetik einer Polypektatlösung bei 234 nm Wellenlänge. A: Zugabe eines inaktivierten *Erwinia*-Extrakts, B: Zugabe eines nicht behandelten *Erwinia*-Extrakts

verwendete *Erwinia*-Extrakt einer Inaktivierung durch Proteinase K und anschließend einer Hitzedenaturierung unterzogen. Dieser inaktivierte *Erwinia*-Extrakt wurde zu einer Polypektatlösung gegeben, und die Absorption der Lösung bei 234 nm Wellenlänge wurde gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Absorption blieb nach einem kurzzeitigen Anstieg konstant, was darauf hinwies, daß keine Oligogalakturonide freigesetzt wurden, also kein enzymatischer Umsatz erfolgte. Als Kontrolle wurde ein unbehandelter *Erwinia*-Extrakt zu dem Ansatz gegeben, woraufhin durch die kontinuierlich ansteigende Absorption Enzymaktivität angezeigt wurde (Abb. 12).

3.11 Knollenscheibentest mit Oligogalakturoniden

Da die bisherigen Experimente gezeigt hatten, daß der *GapC4* Promotor durch den pektolytischen Abbau des Knollengewebes induziert wurde, und daß daran ein diffusibler Faktor beteiligt ist, wurde vermutet, daß möglicherweise die Abbauprodukte der mazerierten Zellwände die Induktion vermitteln. Um dies zu überprüfen, wurde ein Knollenscheibentest mit Oligogalakturoniden als Inokulum angesetzt. Oligogalakturonide entstehen durch den

Abbau von Polypektat oder Pektin durch Pektatlyase. Da es sich bei Pektin um methyliertes Polypektat handelt, entstehen bei der Spaltung von Pektin methylierte und bei der Spaltung von Polypektat nicht methylierte Oligogalakturonide.

Zur Herstellung von Oligogalakturoniden wurden Polypektat oder Pektin durch Pektatlyase partiell gespalten. Zum einen wurde aufgereinigtes Enzym verwendet, zum anderen wurde der bereits unter 3.9 verwendete *Erwinia*-Extrakt eingesetzt, der eine Mischung der von *Erwinia* synthetisierten pektolytischen Enzyme, also auch Pektatlyase, enthält. Um einem kompletten Abbau aller Oligogalakturonide zu Digalakturoniden vorzubeugen, wurden Polypektat oder Pektin bei den Reaktionansätzen im Überschuß eingesetzt. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die pektolytischen Enzyme durch Behandlung mit Proteinase K inaktiviert.

Ein Knollenscheibentest wurde mit transgenen Knollen der Linien 2-13 und 2-17 durchgeführt, bei dem Oligogalakturonide aus den vorstehend beschriebenen Reaktionsansätzen als Inokulum eingesetzt wurden. Nach zweitägiger Inkubation waren die Knollenscheiben noch fest. Bei der anschließenden histochemischen Anfärbung zeigte keine der Scheiben Blaufärbung (nicht gezeigt). Vermutlich wird der *GapC4* Promotor in Kartoffelknollen durch ein anderes mobiles Signal als durch Oligogalakturonide aktiviert. Bei diesem Experiment besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß die Oligogalakturonide nicht in der Lage waren, durch die Zellwand und in die Zelle zu dringen, um dort den Promotor zu induzieren.

3.12 Herstellung von *GapC4*-lys Pflanzen

Da sich herausgestellt hatte, daß der *GapC4* Promotor sowohl durch Anaerobiose als auch durch *Erwinia*-Infektion induzierbar war, wurde mit dessen Hilfe eine Resistenzstrategie erprobt, bei der T4-Lysozym gezielt als antimikrobielles Protein im Interzellularraum der Kartoffelknolle exprimiert wird. Dafür wurde zunächst ein Konstrukt hergestellt, bei dem sich das Gen für T4-Lysozym zusammen mit der DNA-Sequenz des Gerste α -Amylase Signalpeptids unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors befindet. Diese Genkassette wurde in den binären Vektor pSR8-39 überführt. Die Transformation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamms EHA 101 gelang mit diesem Plasmid nicht. Das kann daran liegen, daß der Plasmidtyp, auf dem pSR8-39 beruht, mit diesem Bakterienstamm inkompatibel ist. Stattdessen konnte das Plasmid in den *A. tumefaciens* Stamm GV 3101 überführt werden. Die Transformation von Kartoffel ergab mit diesem Stamm jedoch keine transgenen Pflanzen. GV

3101 ist ein Agrobakterienstamm, bei dem die Virulenzgene, die den Transfer der T-DNA in die pflanzliche Zelle und deren Integration ins Genom vermitteln, nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst durch die Anwesenheit verwundeter Pflanzenzellen induziert werden. Bei dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamms EHA 101 dagegen werden diese Gene konstitutiv exprimiert, wodurch er aggressiver ist und Pflanzen mit höherer Effizienz transformiert. Der Stamm war jedoch nicht mit dem binären Vektor des pSR8-39-Typs transformierbar, weswegen die zu transformierende Genkassette zunächst in pOCA28 kloniert und daraufhin in EHA 101 transferiert wurde. Aus der Transformation von Kartoffel der Sorte Désirée mit diesem Stamm resultierten mehrere transgene Linien (6-x), von denen 10 in vitro vermehrt und zwecks Knollenproduktion im Gewächshaus angebaut wurden.

Die anaerobe Induzierbarkeit des Promotors wurde bei den Linien 6-1 und 6-2 auf Transkriptionsebene untersucht. Blätter dieser Linien wurden 8 h lang anaerob inkubiert, Gesamt-RNA wurde aus ihnen extrahiert und im Formaldehydgel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde ebenfalls RNA aus aerob inkubierten Blättern dieser Linien aufgetragen. Der Northern Blot erfolgte mit der Lysozymsonde wie unter 2.21 beschrieben. Beide Linien zeigten nach anaerober Inkubation deutliche Signale, dagegen konnte bei den aerob inkubierten Proben kein Transkript nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß der *GapC4* Promotor in diesen Linien spezifisch durch Anaerobiose angeschaltet wird und bereits nach 8-stündiger anaerober Inkubationsdauer in Kartoffelblättern aktiv ist.

3.13 Resistenztests

Knollen aller 10 transgenen Linien 6-1 bis 6-11 (außer 6-5), die das T4-Lysozymgen unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen, wurden in 5 Knollenscheibentests auf Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* untersucht. Neben diesen Linien wurden in die Tests auch nicht transgene Knollen (Desi), die transgene Kontrolle 4-6 sowie die zwei transgenen Linien DL4 und DL12 (Düring und Mahn, 1999; P. Porsch, A. Mahn und K. Düring, unveröffentlicht), die das Gen für Lysozym unter der Kontrolle des 35S Promotors tragen, mit einbezogen. Beim Knollenscheibentest wurden aus den Knollen kleine Scheiben definierter Größe gestanzt, verwundet und mit einer bestimmten Anzahl Bakterien inokuliert. Nach der Inkubation mit *Erwinia carotovora* wurde für jede Knollenscheibe der prozentuale Anteil intakten Gewebes bestimmt, wobei ein höherer Anteil intakten Gewebes einer höheren Resistenz entspricht. Aus

den errechneten Werten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Die so ermittelten Prozentsätze intakten Gewebes jeder Linie und Standardabweichungen sind für die 5 durchgeführten Tests in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Im Zuge der 5 durchgeführten Tests wurden die Versuchsbedingungen bezogen auf Inokulummenge, Verwundungsmethode und Inkubationsdauer variiert.

Beim ersten Knollenscheibentest (Abb. 13) wurden zur Infektion jeder Scheibe 2000 Bakterien verwendet, die Verwundung der Scheiben erfolgte mit einer herkömmlichen Nadel, also möglicherweise variierender Einstichtiefe, und eine Inkubationsdauer von 48 Stunden wurde

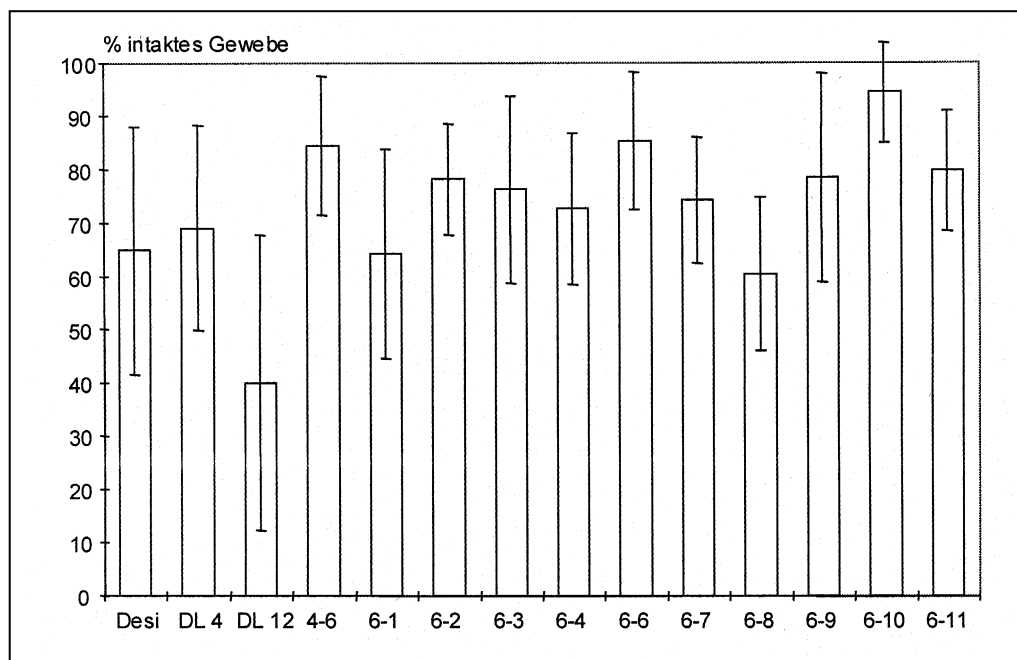


Abb. 13: Erster Knollenscheibentest

Mittelwerte intakten Gewebes und Standardabweichungen der einzelnen Werte des Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

gewählt. Als Ergebnis zeigten sich ein hoher Anteil intakten Gewebes und deutliche Unterschiede im Resistenzverhalten der einzelnen Linien. Beste *GapC4-lys* Linien waren 6-10 und 6-6. Verglichen mit Desi waren 8 der 10 *GapC4-lys* Linien besser, 2 bewegen sich auf dem Niveau von Desi. Jedoch zeigte auch die transgene Kontrolle 4-6 deutlich höhere Resistenz als Desi. Beim Vergleich mit 4-6 schnitt nur die Linie 6-10 besser ab. Die meisten der übrigen *GapC4-lys* Linien waren weniger resistent. Die 35S-*lys* Linie DL4 zeigte bei diesem Test eine nur unwesentlich höhere Resistenz als Desi. Bemerkenswert war der niedrige Wert der Linie DL12, die mit großem Abstand die geringste Resistenz aufwies. Die Standardabweichungen waren, wie für einen Knollenscheibentest mit *Erwinia* bekannt (Düring und Mahn, 1999), sehr

hoch. Sie bewegten sich für die 10 *GapC4-lys* Linien zwischen 10% und 30% bezogen auf das Mittel der Meßwerte. Die höchste Standardabweichung erreichte DL12 mit 69%. Die in diesem Test mit durchschnittlich 94,4% intaktem Gewebe resistensteste Linie 6-10 zeigte mit 10% auch die geringste Standardabweichung.

Wegen der teilweise sehr hohen Anteile nicht mazerierten Gewebes im ersten Test wurde beim zweiten Knollenscheibentest (Abb. 14) ein höheres Inokulum von 5000 Bakterien pro Knollenscheibe gewählt. Um Schwankungen bei der Einstichtiefe zu vermeiden, wurden die Knollenscheiben mit einem Instrument verwundet, das konstant 2,5 mm tiefe Einstiche erzeugt.

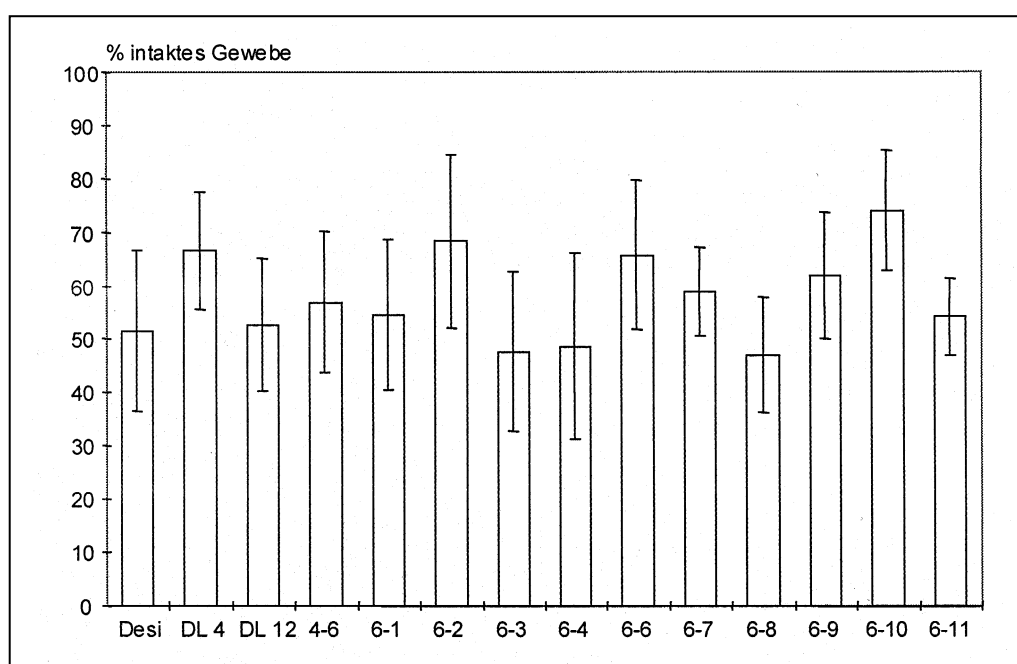


Abb. 14: Zweiter Knollenscheibentest

Mittelwerte intakten Gewebes und Standardabweichungen der einzelnen Werte des Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

Die Inkubationsdauer betrug bei diesem Test 48 Stunden. Im Vergleich zum ersten zeigten sich beim zweiten Test geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Linien. Auch der Anteil intakten Gewebes war bei diesem Test kleiner, was vermutlich auf die höhere Menge verwendeten Inokulums zurückzuführen ist. Die besten Ergebnisse unter den *GapC4-lys* Linien wurden wiederum für die Linie 6-10 ermittelt, gefolgt von 6-2 und 6-6. Im Vergleich zu Desi zeigten 7 *GapC4-lys* Linien höhere Resistenz. Etwas resistenter als Desi war auch die Linie 4-6, und verglichen damit waren noch 5 *GapC4-lys* Linien besser. Auch für DL4 wurde erhöhte Resistenz festgestellt, die nur von den Linien 6-10 und 6-2 leicht übertroffen wurde. Die

Resistenz von DL 12 lag bei diesem Test im Mittelfeld der Linien. Die Standardabweichungen bewegten sich zwischen 13% und 36% und waren im Schnitt mit 22,4% nur unwesentlich geringer als beim ersten Test mit 24,2%.

Beim dritten Test (Abb. 15) wurde mit der Verlängerung der Inkubationsdauer ein weiterer Parameter variiert. Inokuliert wurden die Knollenscheiben mit jeweils 5000 Bakterien, ihre Verwundung erfolgte nach der standardisierten Methode, und die Inkubationszeit wurde auf 60 Stunden erhöht. Das generelle Niveau der Mazeration wurde dadurch jedoch nicht sichtlich gesteigert. Es zeigten sich jedoch größere Unterschiede zwischen den einzelnen getesteten

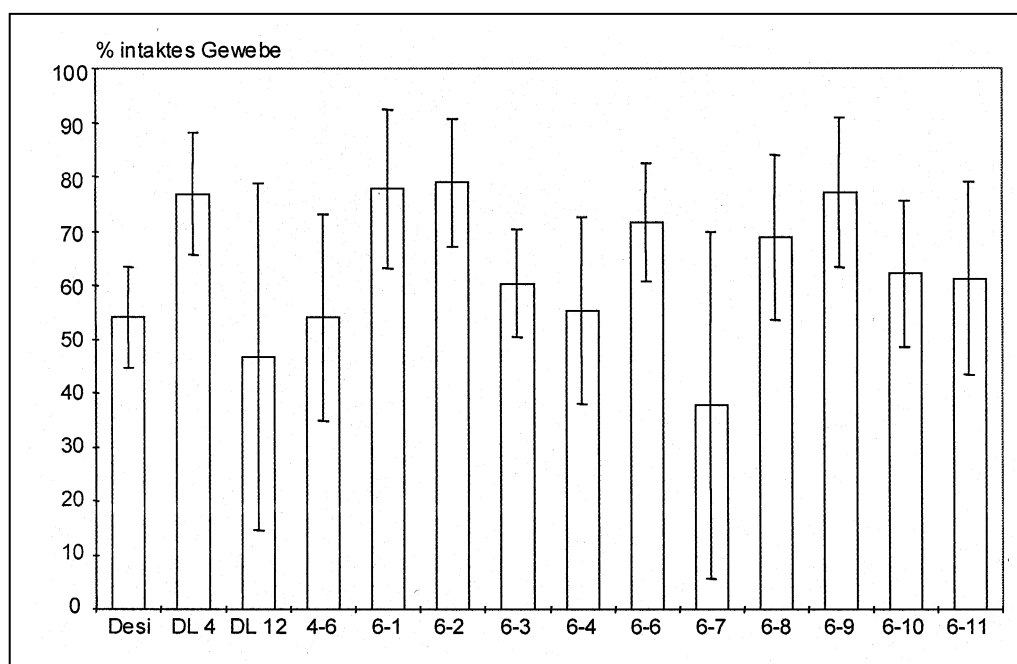


Abb. 15: Dritter Knollenscheibentest

Mittelwerte intakten Gewebes und Standardabweichungen der einzelnen Werte des Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

Linien. Am wenigsten mazeriert waren die Linien 6-2, 6-1 und 6-9. Die geringste Resistenz zeigte die Linie 6-7. Verglichen mit Desi und 4-6, die bei diesem Test etwa gleich hohe Werte aufwiesen, waren 8 der 10 *GapC4-lys* Linien resistenter. Auch DL4 wies einen hohen Anteil intakten Gewebes auf, ihre Resistenz bewegte sich im Rahmen der Werte, die für 6-2, 6-1 und 6-9 gemessen wurden. DL12 schnitt wiederum nicht gut ab, lediglich 6-7 war noch weniger resistent. Das Mittel der Standardabweichungen lag bei diesem Test mit 29,2% deutlich über denen der vorangegangenen Tests. Das ist hauptsächlich auf die am wenigsten resistenten

Linien 6-7 und DL12 zurückzuführen, die mit 85% und 69% Standardabweichung große Schwankungen der einzelnen Meßwerte zeigten.

Bei der Durchführung des vierten Knollenscheibentests (Abb. 16) wurden die Bedingungen des dritten beibehalten. Dennoch waren die ermittelten Werte der einzelnen Linien untereinander einer geringeren Schwankungsbreite unterworfen. Bei diesem Test zeigten die Linien 6-10 und 6-11 das beste Resistenzverhalten. 8 der 10 getesteten *GapC4-lys* Linien wiesen eine höhere Resistenz als 4-6 und Desi auf, lediglich die Linien 6-3 und 6-4 waren schlechter. DL4 zeigte einen hohen Anteil intaktes Gewebe, was nur von 6-10, 6-11 und 6-7 noch übertroffen wurde. Die Standardabweichungen der Linien schwankten zwischen 11% und 55% und lagen mit

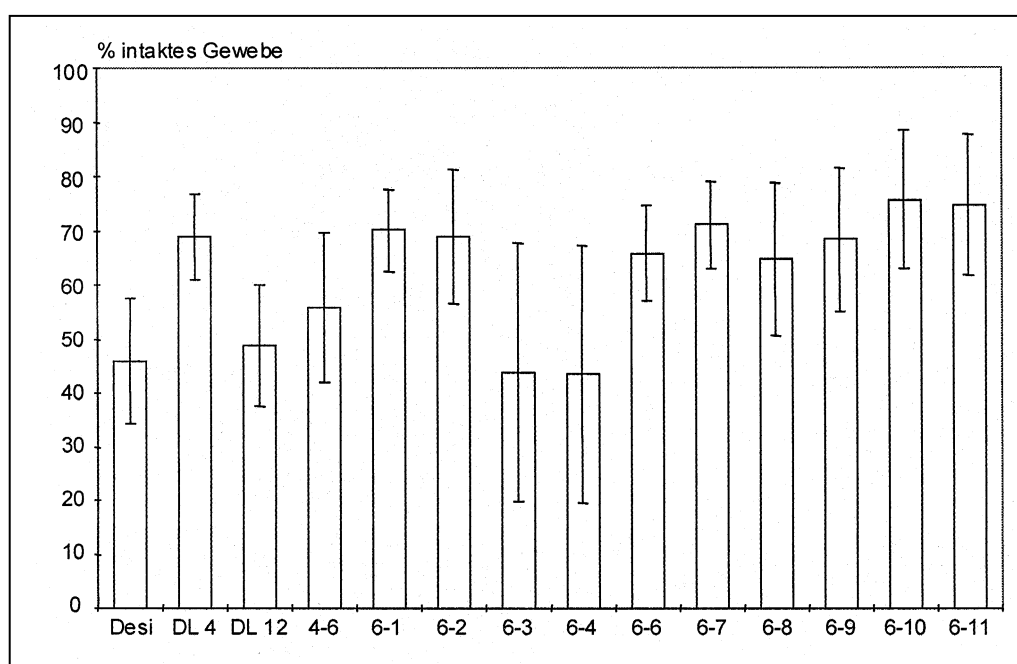


Abb. 16: Vierter Knollenscheibentest

Mittelwerte intakten Gewebes und Standardabweichungen der einzelnen Werte des Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

durchschnittlich 23,1% im Bereich der ersten beiden Tests. Wiederum zeigten die am wenigsten resistenten Linien 6-3 und 6-4 die größten Streuungen ihrer Werte.

Auch der fünfte und letzte Resistenztest (Abb. 17) wurde unter den Bedingungen der beiden vorangegangenen Tests durchgeführt. Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Linien. Die größte Resistenz wies die Linie DL4 auf, dicht gefolgt von 6-10. Als am wenigsten resistent erwies sich Desi, dergegenüber 4-6 eine leicht erhöhte Resistenz zeigte. Alle *GapC4-lys* Linien schnitten bei diesem Test besser als 4-6 ab. Unter ihnen waren 6-3 und 6-4 wiederum am wenigsten resistent. Das relativ homogene Bild zwischen den Linien zeigte

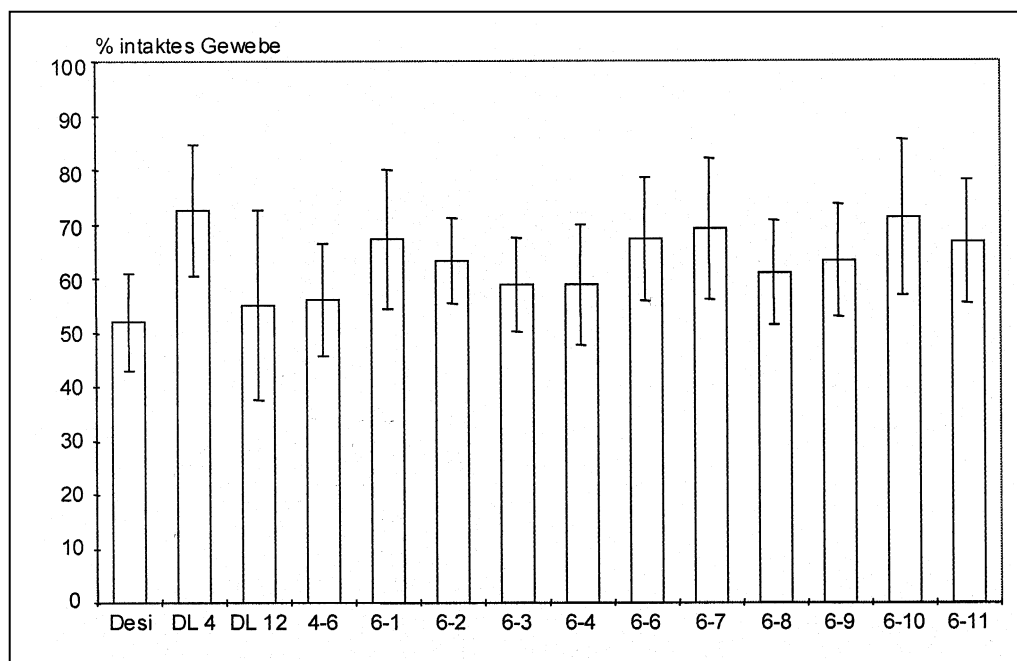


Abb. 17: Fünfter Knollenscheibentest

Mittelwerte intakten Gewebes und Standardabweichungen der einzelnen Werte des Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

sich auch bei den Standardabweichungen, die zwischen 12,6% und 31,8% variierten. Mit durchschnittlich 18,2% relativer Standardabweichung wurde bei diesem Test die geringste Variabilität der Meßwerte beobachtet.

Um die Ergebnisse aller einzelnen Tests zusammenzufassen, wurden alle erhaltenen Werte gemittelt (Abb. 18). Außerdem wurde eine univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Prozedur, Tukey-Test mit der Gesamtheit aller gemessenen Werte durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse war die Bestimmung von Signifikanzgruppen, denen die Linien angehörten. Dabei kann eine Linie auch mehreren Gruppen angehören. Die Angehörigkeit zu Signifikanzgruppen drückt aus, inwieweit sich die Linien voneinander unterscheiden oder auch nicht. Dabei unterscheiden sich mehrere Mitglieder derselben Gruppe nicht signifikant voneinander, oder umgekehrt, signifikante Unterschiede einer Linie existieren nur zu den Mitgliedern von Gruppen, denen diese Linie nicht angehört. Für die Werte aus allen Resistenztests wurden fünf Signifikanzgruppen ermittelt (Tabelle 5). Daraus ergibt sich, daß die Linien 6-1, 6-11, 6-9, 6-2, DL4, 6-6 und 6-10 signifikant besser abschneiden als Desi. Zwar zeigen auch die Linien 6-4, 6-3, 6-8, 4-6 und 6-7 in absoluten Zahlen höhere Resistenz, die jedoch nach dieser Analyse nicht signifikant höher ist. Die transgene Kontrolllinie 4-6 weist absolut gesehen ein besseres Resistenzverhalten als Desi auf, doch die Zugehörigkeit beider Linien zur Gruppe 2 drückt

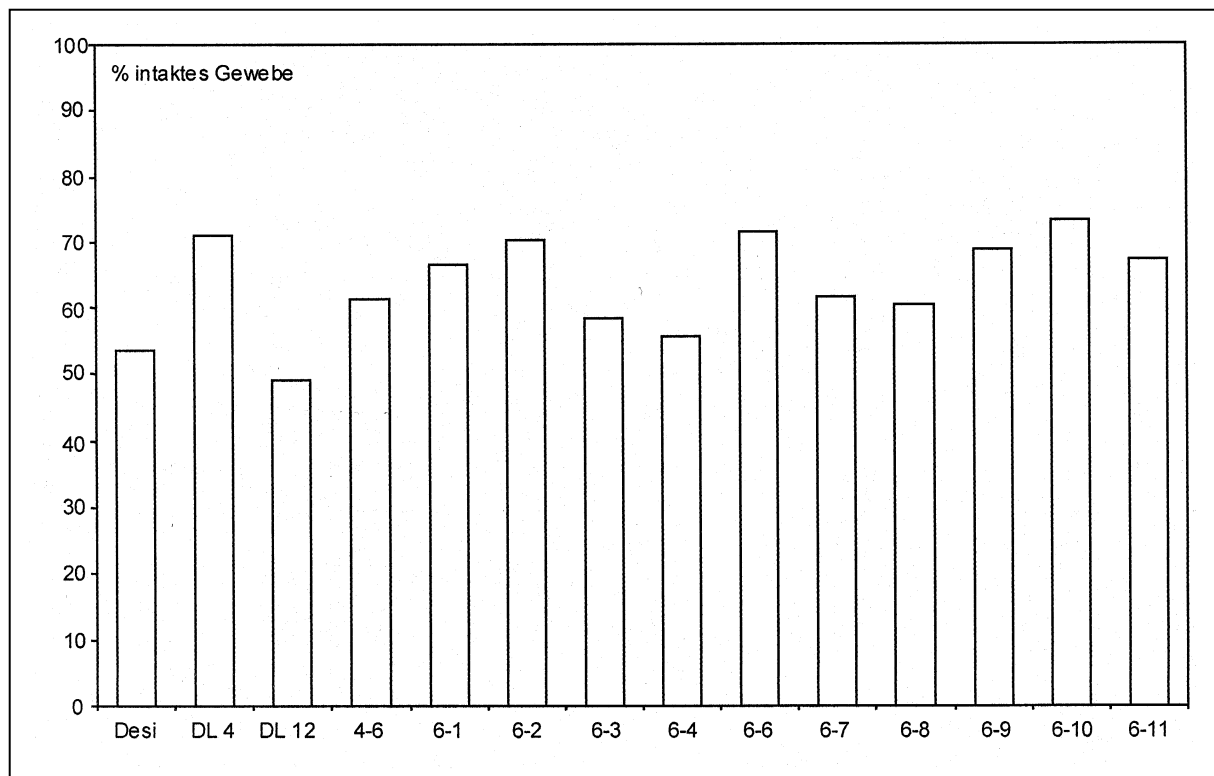


Abb. 18: Zusammenfassung der Resistenztests

Mittelwerte intakten Gewebes aller Werte aus den 5 Knollenscheibentests mit 10 *GapC4-lys* Linien und Kontrollen nach Infektion mit *Erwinia carotovora*

aus, daß sie sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Verglichen mit 4-6 zeigen lediglich die Linien 6-2, DL4, 6-6 und 6-10 eine signifikant höhere Resistenz. DL4 gehört der Gruppe 5 mit den größten Werten an, in der sich neben den vorstehend genannten noch 6-1, 6-11 und 6-9 befinden. Das bedeutet, daß sich 6 der 10 *GapC4-lys* Linien in ihrem Resistenzverhalten nur unwesentlich von DL4 unterscheiden, also eine ähnlich hohe Resistenz gegen *Erwinia carotovora* aufweisen.

Tabelle 5: Signifikanzgruppen

Die Zugehörigkeit der Linien zu den Signifikanzgruppen ist durch die Darstellung der Mittelwerte (% intaktes Gewebe) in den jeweiligen Spalten wiedergegeben. Zur Berechnung wurde eine univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Prozedur, Tukey-Test mit allen Werten aus den 5 Knollenscheibentests durchgeführt. N: Anzahl der Meßwerte

Linie	N	Signifikanzgruppen				
		1	2	3	4	5
DL12	76	49,1				
Desi	80	53,7	53,7			
6-4	80	55,7	55,7			
6-3	84		58,3			
6-8	76		60,4	60,4		
4-6	80		61,4	61,4	61,4	
6-7	76		61,6	61,6	61,6	
6-1	92			66,4	66,4	66,4
6-11	80			67,3	67,3	67,3
6-9	71				68,7	68,7
6-2	68					70,3
DL4	76					70,9
6-6	82					71,5
6-10	72					73,3

4 Diskussion

Das phytopathogene Bakterium *Erwinia carotovora* verursacht bei der Kartoffel die Krankheiten Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule, die zu erheblichen Verlusten auf dem Feld sowie im Knollenlager führen. Da die Schwarzbeinigkeit ihren Ursprung in der Regel in kontaminiertem Pflanzgut hat, kommt der Bekämpfung der Pathogene in der Knolle eine doppelte Rolle zu: Zum einen wird der Zersetzung der eingelagerten Knollen durch Knollennaßfäule vorgebeugt, zum anderen wird der Ausbruch der Schwarzbeinigkeit durch Pflanzung kontaminierter Knollen verhindert. Im Gegensatz zu pilzlichen Pathogenen existiert für Bakterien kein effektiver chemischer Pflanzenschutz, so daß man bei der Bekämpfung der Knollennaßfäule in erster Linie auf die Wahl weniger anfälliger Sorten sowie optimaler Lagerbedingungen der Knollen angewiesen ist. Hohe Temperaturen, hohe Luftfeuchtigkeit und schlechte Durchlüftung im Knollenlager fördern das Wachstum und die Ausbreitung der Bakterien. Außerdem sind die pflanzeigenen Abwehrmechanismen bei niedrigen Sauerstoffgehalten in der Luft weniger aktiv, da in einem solchen Fall der Stoffwechsel in der Knolle reduziert ist. Bereits faulende Knollen verstärken den Effekt dadurch, daß durch die bakterielle Sauerstoffzehrung nicht nur die befallene Knolle vermehrt an Sauerstoffmangel leidet, sondern dieser auch der Umgebung entzogen wird, so daß benachbarte Knollen in Mitleidenschaft gezogen werden und sich die Krankheit schnell ausbreitet. Aus diesen Gründen sollte zur Bekämpfung von *Erwinia carotovora* in der Knolle eine Strategie gewählt werden, die besonders bei Sauerstoffarmut oder unter anaeroben Bedingungen wirkt.

Als erfolgreich haben sich bisher Resistenzstrategien erwiesen, bei denen Pflanzen mittels Gentechnik mit einem zusätzlichen antimikrobiellen Gen ausgestattet werden. Die Expression dieser Gene wird in der Regel nicht gezielt kontrolliert, vielfach wird der als in Pflanzen stark und konstitutiv geltende 35S Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus verwendet. Transiente Genexpressionsexperimente beim Mais zeigten jedoch, daß dieser Promotor unter anaeroben Bedingungen nicht aktiv ist (U. Köhler, pers. Mitteilung). Deshalb wurde vermutet, daß dies ebenfalls für die Kartoffel zutreffen könnte. Aus dieser Überlegung heraus entstand die Strategie, zur Kontrolle eines gegen *Erwinia carotovora* gerichteten Gens einen anaerob induzierbaren Promotor zu verwenden, um dadurch gezielt einen antimikrobiellen Faktor unter den für die Krankheitsentwicklung günstigen, sauerstoffarmen Bedingungen zu exprimieren.

Untersuchungen an transgenem Tabak hatten ergeben, daß der *GapC4* Promotor aus Mais unter anaeroben Bedingungen in allen Geweben stark induzierbar ist, während er unter aeroben Bedingungen nicht aktiv ist (Köhler et al., 1996). Das Verhalten dieses Promotors sollte nun in der Kartoffel untersucht werden. Dabei war zu klären, ob der *GapC4* Promotor in der Kartoffel zum einen durch Anaerobiose induzierbar ist, und ob er zum anderen in Knollen aktiviert wird, wenn diese mit *Erwinia carotovora* infiziert sind.

Zunächst wurde das anaerobe Verhalten des 35S Promotors analysiert, um zu überprüfen, ob dieser in Kartoffel unter anaeroben Bedingungen tatsächlich abgeschaltet wird. Reporterproteine eignen sich schlecht zum Studium des Abschaltverhaltens eines Promotors, da die Proteine stabiler als ihre mRNA sein können, und somit das Abschalten der Transkription lediglich verzögert widerspiegeln. Deshalb wurden RNA-Hybridisierungen mit zwei unabhängigen transgenen Kartoffellinien durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß in Kartoffelblättern bereits nach einer Verweildauer von 8 h im anaeroben Milieu kein Signal mehr detektierbar ist, also der 35S Promotor bei Anaerobiose abgeschaltet wird. Somit ist die Anwendung dieses Promotors bei der Bekämpfung der Knollennaßfäule nur bedingt geeignet, da während der für die Vermehrung und Ausbreitung der Bakterien günstigen, anaeroben Bedingungen keine Neusynthese antimikrobiellen Proteins erfolgen würde. In einem solchen Fall stünde der Knolle lediglich die unter aeroben Bedingungen akkumulierte Proteinmenge zur Verfügung, die jedoch dem üblichen Proteinabbau unterliegen würden. Dieses Resultat bestätigt die Notwendigkeit, einen unter anaeroben Bedingungen aktiven Promotor zur effektiven Bekämpfung der Knollennaßfäule einzusetzen.

4.1 Anaerobe Induktion

In transgenem Tabak hatte der *GapC4* Promotor bereits eine starke anaerobe Induzierbarkeit bewiesen. Zur Untersuchung des Promotorverhaltens in Kartoffel wurden transgene Pflanzen erzeugt, die das Gen für β -Glucuronidase unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen. Alle getesteten Linien zeigten nach 40-stündiger Anaerobiose bis auf eine Ausnahme starke Expression. Dagegen waren unter aeroben Bedingungen keine Signale nach histochemischer Anfärbung detektierbar. Es wurde keine Gewebespezifität der Promotorinduktion festgestellt. Die Induktion erfolgte ubiquitär in Blättern, Stengeln, Wurzeln und Knollen. Mit Kartoffelknollen wurde zum ersten Mal ein pflanzliches Speicherorgan identifiziert, in

welchem sich dieser anaerob induzierbare Promotor gezielt aktivieren läßt. Nach Quantifizierung der Expressionsstärke wurden für Blätter Induktionsfaktoren bis 1104-fach ermittelt, in Knollen wurde der Promotor bis zu 74-fach induziert. Die relative Stärke der anaeroben Expression lag bei zwei Linien in Blättern bei 20% verglichen mit der Stärke des 35S Promotors unter aeroben Bedingungen, in Knollen wurden maximal 15% erreicht (Tabelle 6). Die absoluten anaeroben Signalstärken waren in Knollen nur geringfügig niedriger als in Blättern, doch ergaben sich bei Knollen höhere Werte unter aeroben Bedingungen, wodurch die in Blättern mehr als 10-fach größeren Induktionsfaktoren zu erklären sind (Tabelle 6).

Tabelle 6: Induktionsfaktoren und Expressionsstärken

Induktionsfaktoren des *GapC4* Promotors in anaerob inkubiertem und mazeriertem Gewebe verglichen mit aerob inkubiertem bzw. nicht mazeriertem Gewebe. Expressionsstärken des *GapC4* Promotors in den jeweiligen Geweben relativ zur Stärke des 35S Promotors unter aeroben Bedingungen. Mittelwerte über alle getesteten Linien sowie Höchstwerte.

	Induktionsfaktoren	Expressionsstärken
Blatt anaerob		
Durchschnitt	308	10%
Maximum	1104	20%
Knolle anaerob		
Durchschnitt	38	7,5%
Maximum	74	15%
Knolle mazeriert		
Durchschnitt	25	3,9%
Maximum	99	8%

Transgene Tabaklinien, die mit dem gleichen *GapC4*-GUS Konstrukt transformiert worden waren, sind von Köhler et al. (1996) untersucht worden. Im Tabak hatte der Promotor zu einer ähnlich starken, ubiquitären anaeroben Induktion geführt. Jedoch wiesen die Werte für die anaerobe Expressionsstärke der einzelnen Linien eine breitere Streuung über beinahe drei Zehnerpotenzen auf, wobei bei einer Linie unter anaeroben Bedingungen eine etwa doppelt so große Fluoreszenz verglichen mit der 35S-GUS Referenz nachgewiesen wurde. Im Schnitt lagen die Induktionsfaktoren mit 659-fach etwa doppelt so hoch wie bei Kartoffelblättern, der höchste Wert betrug 2385-fach. Auch die Induktionsfaktoren der einzelnen Linien streuten breiter verglichen mit denen für Kartoffel. In Tabak wurde beobachtet, daß sich der Promotor durch Verwundung schwach induzieren läßt, was bei der Kartoffel nicht der Fall ist.

Der *GapC4* Promotor wird auch im Mais durch anaerobe Bedingungen induziert. Dies wurde auf Proteinebene in nicht transgenen Pflanzen (Russell und Sachs, 1992) sowie im transienten System durch Kopplung mit einem Reportergen (Köhler et al., 1995; Manjunath und Sachs, 1997; Bailey-Serres und Dawe, 1996) beobachtet. Es konnte eine dreifach höhere Expressionsstärke unter Anaerobiose nachgewiesen werden (Manjunath und Sachs, 1997), womit die Induktionfaktoren jedoch nicht annähernd die Werte erreichen, die für transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen ermittelt wurden.

Der *GapC4* Promotor zeigt in Kartoffel verglichen mit anderen anaerob induzierbaren pflanzlichen Promotoren herausragende Eigenschaften. Getestet wurde der *Adh1* Promotor aus Mais in transgenem Tabak (Ellis et al., 1987) und Reis (Kyojuka et al., 1991), der *Arabidopsis GapC* Promotor in Tabak (Yang et al., 1993) und der *Arabidopsis Adh* Promotor in transgenen Arabidopsispflanzen (Dolferus et al., 1994) sowie transient in *Arabidopsis*, *Nicotiana plumbaginifolia* und *Pisum sativum* (Hoeren et al., 1998). Der Mais *Adh1* Promotor zeigt in transgenem Reis eine 81-fache anaerobe Induzierbarkeit lediglich in den Wurzeln von Keimlingen, wohingegen in einigen Blütenorganen konstitutive Expression beobachtet wurde. In Tabak zeigte der Promotor zunächst keine anaeroben Signale, erst nach Fusion des Promotors mit dem Octopinsynthase-Enhancer wurde eine 10- bis 20-fache Induktion festgestellt. Der *GapC* Promotor aus *Arabidopsis* wird in transgenem Tabak nach anaerober Inkubation etwa zweifach induziert, wobei die Induktion gewebespezifisch ist und sich vornehmlich auf Wurzeln beschränkt. Außerdem zeigt der Promotor in Wurzelspitzen starke und in Blättern sowie Stengeln schwache konstitutive Aktivität. Ebenfalls in *Arabidopsis* wurde der homologe *Adh* Promotor getestet, indem er mit dem Gen für β -Glucuronidase fusioniert und in *Arabidopsis* transformiert wurde. Nach 48-stündiger anaerober Inkubation wurde eine bis zu 50-fache Induktion beobachtet, die sich allerdings auf die Wurzeln beschränkte. Somit zeigt der *GapC4* Promotor in Kartoffel wie auch in Tabak verglichen mit anderen pflanzlichen anaerob induzierbaren Promotoren eine höhere anaerobe Induzierbarkeit, so gut wie keine Aktivität unter aeroben Bedingungen und Induktion in allen Geweben.

Wie in Tabak wurde auch in Kartoffel eine rasche Promotoraktivierung auf mRNA-Ebene festgestellt. In Tabak konnte bereits nach einer anaeroben Inkubationsdauer von 4 h Transkript mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden. In Kartoffel wurden nach 8-stündiger Inkubation von Blättern starke Signale detektiert. Die Transkription wird folglich durch

kurzzeitiges anaerobes Inkubieren gestartet, das jeweilige fusionierte Gen ist damit schnell anschaltbar.

4.2 Induktion durch *Erwinia*

Durch die anaerobe Induzierbarkeit des Promotors in Knollen war gezeigt worden, daß die Expression eines antimikrobiellen Proteins durch den Promotor unter den für die Ausbreitung der Knollennaßfäule günstigen Bedingungen gezielt aktiviert werden kann. Doch bei massivem Befall mit Bakterien und in bereits angefaulten Knollen schreitet die Krankheit selbst bei sachgemäßer Lagerung voran. Somit war zu klären, ob der Promotor auch in bereits infizierten Knollen induziert wird. Dieser Frage lag die Überlegung zugrunde, daß beim *Erwinia*-Befall der Kartoffelknolle, bei der sich ein bakterieller Schleim über die Knolle legen kann, anaerobe Bedingungen in der Knolle durch Sauerstoffzehrung der Pathogene entstehen können. Promotorinduktion in Knollenscheiben wurde nach Infektion mit *Erwinia carotovora* und vollständiger Mazeration des Gewebes festgestellt. Die Werte für die GUS-Aktivität lagen dabei etwa um ein Drittel unter denen nach anaerober Inkubation, folglich waren auch die Induktionsfaktoren mit durchschnittlich 25-fach kleiner als bei anaeroben Knollen, die im Mittel 38-fach induziert wurden (Tabelle 6). Die weniger starken Signale sind eventuell darauf zurückzuführen, daß die Anaerobiose in den Knollenscheiben durch die Infektion mit Bakterien nicht die Qualität erreicht, wie dies auf chemischem Wege im Anaerobentopf geschieht. Dagegen spricht allerdings, daß die Werte einerseits stärker streuen als nach anaerober Induktion und andererseits das Verhalten der einzelnen Linien unter Infektionsbedingungen nicht mit dem Verhalten nach Anaerobiose korreliert. So zeigt z.B. die am stärksten anaerob induzierbare Linie 2-12 nach *Erwinia*-Infektion ein unterdurchschnittliches Signal, ebenso wird die am besten durch Bakterien induzierbare Linie 2-13 lediglich mittelmäßig stark durch anaerobe Bedingungen induziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der *GapC4* Promotor in der Kartoffel nicht nur durch Anaerobiose, sondern durch einen weiteren Induktionsstimulus bei bakterieller Infektion und Mazeration von Knollengewebe aktiviert werden kann.

Durch offenes Plazieren einer infizierten Knollenscheibe in einer Sterilbank wurde gewährleistet, daß ein ständiger Luftstrom über die Knollenscheibe strich. Damit sollte die Ausbildung von anaeroben Bedingungen in der Knollenscheibe verhindert werden. Nach 24-

stündiger Inokulation war lediglich der mittlere Teil der Knollenscheibe mazeriert. Dieser wurde von dem intakten äußeren Ring getrennt, und beide Gewebe wurden histochemisch analysiert. Der mazerierte innere Teil der Knollenscheibe zeigte dabei eine starke Blaufärbung, was bewies, daß es keiner anaeroben Bedingungen während der *Erwinia*-Infektion bedarf, um den *GapC4* Promotor zu induzieren. Der äußere intakte Ring wurde ebenfalls angefärbt, und an dessen Innenseite wurde eine deutliche Blaufärbung sichtbar. Weitergehende Experimente zeigten, daß in direkter Nachbarschaft zum infizierten Teil der Knollenscheibe 80%, in einem Abstand von 2 bis 4 mm etwa 50% und in 20 mm Entfernung noch 30% GUS-Aktivität verglichen mit dem vollständig mazerierten Gewebeteil zu messen war. Die kontinuierliche Abnahme der Expressionsstärken in Abhängigkeit von der Entfernung zum mazerierten Teil der Knolle läßt darauf schließen, daß die Ursache für die Promotorinduktion vom mazerierten Teil der Knollenscheibe ausgeht. Mit einem weiteren Versuch wurde gezeigt, daß der Promotor in intaktem *GapC4*-GUS Knollengewebe durch die Berührung mit einer infizierten, nicht transgenen Knollenscheibe induziert wird. Ferner konnte ausgeschlossen werden, daß Diffusion der β -Glucuronidase die Ursache für die Signale im nicht mazerierten Knollengewebe ist. Folglich muß ein mobiler Induktionsfaktor vorliegen, der ausgehend von der Infektionsstelle in und durch intaktes Gewebe diffundiert und dort den Promotor induziert. Wichtig ist diese Eigenschaft für den Einsatz des *GapC4* Promotors in Kombination mit einem antimikrobiellen Gen, denn dieses Gen würde einerseits unter anaeroben Bedingungen aktiviert werden und andererseits auch bei *Erwinia*-Infektion. Die durch den Pathogenbefall induzierte Expression würde sich dabei nicht auf den bereits mazerierten Teil der Knolle beschränken, sondern auch vorbeugend in entfernterem, noch intaktem Gewebe auftreten.

4.3 Induktion durch pektolytische Enzyme

Die These von der Existenz eines mobilen Faktors wurde erhärtet, indem gezeigt wurde, daß es keiner lebenden Bakterien bedarf, um den Promotor zu induzieren. Verschiedene sterile *Erwinia*-Extrakte sowie aufgereinigte pektolytische *Erwinia*-Enzyme sind in der Lage, Promotorinduktion zu vermitteln. Dabei geht die Induktion des Promotors immer mit der Mazeration des Knollengewebes einher, denn *Erwinia*-Extrakte und die Enzyme Pektatlyase und Polygalakturonase zersetzen das Knollengewebe und vermitteln die Induktion des Promotors, wohingegen Cellulase und Pektinmethylesterase weder Knollenmazeration noch

Promotorinduktion bewirken. Da die pektolytischen Enzyme allein aufgrund ihrer Größe sicherlich nicht in der Lage sind, durch das intakte Knollengewebe zu diffundieren ohne es dabei zu mazerieren, kann man davon ausgehen, daß es sich bei dem mobilen Induktionsfaktor um ein kartoffeleigenes Signalmolekül handelt, das möglicherweise bei der Degradation der Zellwand entsteht oder freigesetzt wird.

Pektolytische *Erwinia*-Enzyme spalten die pflanzlichen Zellwandbestandteile Pektin und Polypektat in kurze Oligomere, wobei hauptsächlich Dimere und Trimere entstehen (Forrest und Lyon, 1990; Preston et al., 1992; Bartling et al., 1995). Vielfach ist das Freisetzen von Oligogalakturoniden durch extrazelluläre *Erwinia*-Enzyme als Induktionsstimulus der pflanzlichen Pathogenabwehr beschrieben worden (Davis et al., 1984; Yang et al., 1992; Palva et al., 1993). Oligogalakturonide induzieren eine Reihe von Reaktionen der Pflanze, die in den meisten Fällen vom Polymerisationsgrad abhängig sind. Unter anderem wird die Phosphorylierung membrangebundener Proteine (Farmer et al., 1991; Reymond et al., 1995), Akkumulation von Phytoalexinen und Lignifikation (Ebel und Cosio, 1994), Induktion von Proteinaseinhibitoren (Ryan, 1988), Jasmonatsynthese (Doares et al., 1995) und Biosynthese von Ethylen (Tong et al., 1986) durch Oligogalakturonide stimuliert. Meist wird berichtet, daß die Pathogenantwort der Pflanze durch Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad von 9 und höher induziert wird (Darvill et al., 1992), doch auch kleinere Oligomere spielen dabei eine Rolle. Oligogalakturonide mit einem Polymerisationsgrad zwischen 2 und 4 sind in der Lage, in *Arabidopsis* Gene der Jasmonatbiosynthese (Norman et al., 1999) und in Kartoffel Resistenz gegen *Erwinia carotovora* zu vermitteln (Weber et al., 1996; Wegener et al., 1996). Ferner wurde gezeigt, daß bei einem Polymerisationsgrad kleiner 8 die Ethylenproduktion durch Oligogalakturonide vermittelt wird (O'Donnell et al., 1996; Simpson et al., 1998) und Proteinaseinhibitoren in der Tomate akkumuliert werden (Moloshok et al., 1992; O'Donnell et al., 1996).

Um zu testen, ob es sich bei dem Induktionsfaktor des *GapC4* Promotors in Knollen um ein Oligogalakturonid handelt, wurden Pektin und Polypektat durch partiellen Verdau mit Pektatlyase und Polygalakturonase in ungesättigte und gesättigte Oligomere gespalten. Nach Inaktivierung der pektolytischen Enzyme wurden die Oligogalakturonide auf *GapC4*-GUS Knollenscheiben gegeben. Daraufhin zeigten die Knollenscheiben, die alle nicht mazeriert wurden, jedoch keine Signale. Entweder handelt es sich bei dem Induktionfaktor nicht um ein

Oligogalakturonid, oder die Oligogalakturonide dringen nicht in die Zellen ein. Es ist möglich, daß deren Diffusion durch die Zellwände stark behindert wird und die Zellmembran für die Oligogalakturonide nicht erreichbar ist. Dies ließe sich in weiteren Experimenten klären, bei denen die Zellwände des Knollengewebes vor der Inkubation mit den Oligogalakturoniden durch eine Behandlung mit Cellulase abgebaut werden, oder die Oligogalakturonide zu zellwandlosen Protoplasten gegeben werden. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei dem Verfahren zur Herstellung der Oligogalakturonide die induzierenden Oligomere in ungenügender Menge gebildet wurden.

4.4 Resistenztests

Zur Erprobung der biotechnologischen Anwendbarkeit des *GapC4* Promotors wurden transgene Kartoffelpflanzen hergestellt, die das Gen für Lysozym aus dem Bakteriophagen T4 unter der Kontrolle des *GapC4* Promotors tragen. Zur Sekretion in den Interzellularraum wurde den Lysozymgen die DNA-Sequenz des α -Amylase-Signalpeptids aus Gerste vorangestellt. Fünf unabhängig voneinander durchgeführte Knollenscheibentests, bei denen die nicht transgene Ausgangssorte, eine transgene Kontrolllinie 4-6, die nur den Selektionsmarker trug, und zwei 35S-Lysozym-Linien, DL4 und DL12, als Kontrollen mit einbezogen wurden, ergaben bei Betrachtung aller absoluten Werte, daß die 10 getesteten Linien erhöhte Resistenz aufwiesen, wenn sie mit der nicht transgenen Kontrolle verglichen wurden. Im Vergleich zur transgenen Kontrolllinie 4-6 schnitten 7 Linien besser ab als diese. Während DL4 eine höhere Resistenz als die Ausgangssorte und die transgene Kontrolle zeigte, war DL12 die am wenigsten resistente Linie. Zwei *GapC4-lys*-Linien zeigten ein noch besseres Resistenzverhalten als DL4. Durch univariate Varianzanalyse der gesamten Daten wurden fünf Signifikanzgruppen ermittelt. Aus dieser Berechnung ergab sich, daß 6 Linien signifikant besser abschnitten als die nicht transgene Kontrolle, 3 Linien wiesen eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber der transgenen Kontrolle auf. Nicht signifikant war dagegen die gesteigerte Resistenz der beiden Linien, die sich in absoluten Werten resistenter als DL4 gezeigt hatten. 6 *GapC4-lys* Linien weisen durch ihre Zugehörigkeit zur Signifikanzgruppe von DL4 ähnliches Resistenzverhalten wie DL4 auf (Tabelle 5). Die große Anzahl von Linien mit erhöhter Resistenz ist überraschend, da die getesteten *GapC4-lys* Linien nicht auf hohe Expressionsstärken des T4-Lysozyms vorselektiert worden waren.

Bei DL4 handelt es sich nach den hier vorgestellten Ergebnissen um eine Linie mit erhöhter Resistenz gegen *Erwinia carotovora*. Auch bei einem Halbknollentest mit Freilandmaterial hatte DL4 signifikant besser abgeschnitten als die Ausgangssorte und die transgene Kontrolle (Düring und Mahn, 1999). Bei zwei unabhängigen Knollenscheibentests mit Freilandknollen zeigte DL4 aus Ernten zweier Jahre jedoch das reproduzierbar gleiche Resistenzverhalten wie die nicht transgene und die transgene Kontrolle. Die Linie DL12, welche die geringste Resistenz aller getesteten Linien aufwies, hatte bei drei Knollenscheibentests mit Knollen aus dem Gewächshaus ebenfalls signifikant schlechter abgeschnitten als DL4, jedoch unsignifikant besser als die Ausgangssorte (A. Mahn, pers. Mitteilung).

Dem Knollenscheibentest wird verglichen mit anderen Resistenztestmethoden eine höhere Streuung der Einzelwerte bescheinigt (Lojkowska und Kelman, 1994). Die hohe Variation der Ergebnisse bei dem Verfahren verlangt nach einer großen Anzahl von Meßwerten, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Linien festzustellen. Außerdem kann es zu Schwankungen von einem Testzeitpunkt zum nächsten kommen, da die Aggressivität des Inokulums beim Infizieren der Knollen variieren kann. Dadurch kann es vorkommen, daß die Knollenscheiben in der Inkubationszeit zu stark oder komplett mazeriert werden und somit die Unterschiede zwischen den Linien nicht mehr erkennbar sind. Bei zeitlich auseinanderliegenden Tests spielen auch Lagerdauer und Lagerbedingungen der Knollen eine Rolle. Es wurde beobachtet, daß sich frisch geerntete Knollen einer Infektion durch *Erwinia* stärker widersetzen als länger gelagerte (A. Mahn, pers. Mitteilung). Aus diesen Gründen verwundert es nicht, daß die Standardabweichungen aller Meßwerte für die einzelnen Linien im Schnitt bei 26,8% bezogen auf die Mittelwerte lag. Für die Standardabweichungen der einzelnen Tests errechnete sich mit durchschnittlich 22,5% ein geringerer Wert, was statistisch ausdrückt, daß die 5 durchgeführten Tests untereinander variierten. Bei Knollenscheibentests mit Freilandmaterial ergaben sich Standardabweichungen um 20% (A. Mahn, pers. Mitteilung), doch Ergebnisse, welche mit Freilandknollen erzielt werden, sind mit Daten, die mit Knollen aus dem Gewächshaus ermittelt werden, nur bedingt vergleichbar. Zum einen sind Freilandknollen in der Regel größer und liegen auch in höherer Stückzahl vor, so daß dieselbe Anzahl Knollenscheiben immer aus dem gleichen Teil jeder Knolle ausgestanzt werden kann. Dadurch werden beim Test Variationen vermieden, die durch unterschiedliche Anfälligkeiten der Knollengewebearten (Bain und Pérombelon, 1988) hervorgerufen werden. Außerdem kann

aus jeder Knolle die gleiche Anzahl Scheiben hergestellt werden, was den Test homogener macht, da alle Knollen gleich gewichtet werden. Zum anderen sind die Knollen bei Freilandmaterial untereinander homogener, denn im Gewächshaus herrschen zeitlich und in Abhängigkeit vom Standort der Pflanzen unterschiedliche Bedingungen. Werden die Kartoffeln in Töpfen angebaut, so sind die Pflanzen voneinander getrennt und Einflüsse bleiben lokal beschränkt, so daß die Pflanzen von Topf zu Topf verschiedenen Wachstumsbedingungen unterworfen sein können. Die höhere Variabilität der Knollen aus dem Gewächshaus konnte durch einen vergleichenden Knollenscheibentest mit nicht transgenem Freilandmaterial bestätigt werden, bei dem sich eine Standardabweichung von 8,4% ergab (A. Mahn und L. Bülow, unveröffentlicht).

4.5 Induktionsstimuli

Der Mais *GapC4* Promotor wird in Tabak unter anaeroben Bedingungen stark induziert. Beim Studium des Induktionsverhaltens des Promotors in Kartoffel wurde gezeigt, daß er auch hier durch Anaerobiose stark induzierbar ist. Die Induzierbarkeit erstreckt sich dabei nicht nur auf Blätter, Stengel und Wurzeln, sondern auch auf Knollen. Darüber hinaus wird der Promotor in Kartoffelknollen durch *Erwinia*-Infektion aktiviert, was zunächst dadurch erklärt wurde, daß *Erwinia carotovora* bei der Infektion und Mazeration des Knollengewebes durch Sauerstoffzehrung und Überzug mit einem bakteriellen Schleim im befallenen Gewebeteil anaerobe Bedingungen erzeugt. Überraschenderweise wird der Promotor auch in den aeroben Teilen des Knollengewebes, die sich um eine Infektionsstelle herum befinden, induziert. Die durch ein Pathogen vermittelte Aktivierung stellt einen weiteren Induktionsweg für diesen Promotor dar, der bislang nicht beschrieben wurde. Somit besteht die Möglichkeit, daß der Promotor bei einer *Erwinia*-Infektion früh genug im noch nicht befallenen Gewebe induziert wird, um ein gegen das Pathogen gerichtetes Gen vorbeugend zu exprimieren, noch bevor das Gewebe vom Bakterium erreicht und degradiert wird. Vermutlich wird ein mobiler Faktor bei der Infektion und Mazeration der Knolle freigesetzt, welcher in das gesunde Gewebe diffundiert und dort auf den Promotor wirkt. Durch die Tatsache, daß zur Promotorinduktion keine lebenden Bakterien notwendig sind, wurde diese These erhärtet. Da isolierte pektolytische Enzyme in der Lage sind, den Promotor zu aktivieren, und die Induktion mit der Mazeration des Knollengewebes korreliert, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei

dem mobilen Faktor um ein Signalmolekül handelt, welches bei der Degradation des Pektins der Knollenzellwände entsteht oder freigesetzt wird.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Laxalt et al. (1996) interessant, die zeigten, daß cytosolische GAPDH in der Kartoffel auch pathogeninduzierbar ist. Ausgehend von der Tatsache, daß einige für Enzyme der Glykolyse kodierende Gene in Pflanzen unter Streßbedingungen, insbesondere Anaerobiose, induziert werden (Springer et al. 1986; Dennis et al. 1988; Russell und Sachs, 1989), und der Überlegung, daß die Pflanze bei Pathogenbefall ihren Stoffwechsel und die Atmungsrate erhöht (Uritani und Asahi, 1980) und die Produkte der Glykolyse Substrate für die mitochondriale Atmung darstellen, wurde der Zusammenhang von Infektion durch *Phytophthora infestans* und cytosolischer GAPDH-Expression in der Kartoffel analysiert. Laxalt et al. (1996) stellten fest, daß der phytopathogene Pilz bei der Kartoffelinfektion *GapC*-mRNA-Transkription induziert. Ferner zeigte sich eine *GapC*-mRNA-Akkumulation in Knollen nach Zugabe eines pilzlichen Elicitors. Auch Salicylsäure, ein endogenes Signal zur SAR-Induktion, war in der Lage, in Blättern die *GapC*-Transkription zu erhöhen. Laxalt et al. schließen daraus, daß die cytosolische GAPDH-Induktion in der Kartoffel nicht nur unter abiotischen, sondern auch biotischen Streßbedingungen erfolgt, und vermuten, daß die Regulation in beiden Fällen über ähnliche Wege der Signaltransduktion läuft. Für das überraschende Ergebnis dieser Arbeit, daß der *GapC4* Promotor in Kartoffelknollen nicht nur durch Anaerobiose, sondern auch durch *Erwinia*-Infektion und pektolytische Enzyme induziert wird, könnte dies eine Erklärung sein. Möglicherweise laufen Teile der komplexen Pathogenantwort der Pflanze und die Stoffwechselregulation bei der Induktion des *GapC4* Promotors an einer Stelle zusammen, womit erklärbar wird, daß so unterschiedliche Stimuli auf den Promotor wirken.

4.6 Ausblick

Der Einsatz des *GapC4* Promotors in der Kartoffel vermittelt in Kombination mit T4-Lysozym erhöhte Resistenz gegenüber der Knollennaßfäule. Für die Pflanze bietet die Verwendung eines induzierbaren Promotors zur Fremdgenexpression verglichen mit der konstitutiven Synthese einen ökonomischen Vorteil, da lediglich bei Bedarf das entsprechende Protein synthetisiert wird. Außerdem beugt das induzierbare System möglichen Resistenzbrechungen durch Pathogene vor, denn bei zeitlich und örtlich beschränkter

Expression bieten sich den Krankheitserregern weniger Möglichkeiten der Adaptation. Die gerichtete Fremdproteinexpression ist auch wichtig im Zusammenhang mit der erhöhten biologischen Sicherheit. Letztlich könnte dies die öffentliche Akzeptanz für den Einsatz der Gentechnik in der Resistenzzüchtung fördern, denn Fremdprotein wird nicht ständig produziert und freigesetzt.

Der Einsatz von transgenen Pflanzen, die das Lysozymgen tragen, ist ein vielversprechender Ansatz bei der Bekämpfung pflanzlicher Pathogene (Düring, 1996). Für T4-Lysozym und Hühnereiweiß-Lysozym zeigte sich, daß sie nicht nur über die vielfach beschriebene Muramidaseaktivität verfügen, sondern auch im denaturierten Zustand bakterizid wirken (Düring et al., 1999; Pellegrini et al., 1992; 1997). Für T4-Lysozym wird außerdem ein erweitertes Wirkspektrum beschrieben, was sich u.a. auch auf Pilze erstreckt (Düring et al., 1999), wodurch es für breit angelegte antimikrobielle Resistenzstrategien anwendbar wird.

Es ist denkbar, den Promotor auch zur pathogeninduzierten Steuerung anderer Gene von antibakteriellen oder fungiziden Proteinen zu nutzen. Die Promotorinduktion wird bei der *Erwinia*-Infektion durch den pektolytischen Abbau der pflanzlichen Zellwand induziert, demnach könnten auch andere Pathogene der Kartoffel, die pflanzliche Zellwände mit pektolytischen Enzymen degradieren, in der Lage sein, auf den Promotor zu wirken. Da sich der Promotor in Kartoffel und Tabak ähnlich verhält, ist das System wahrscheinlich auch auf andere dikotyle Pflanzen übertragbar.

Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich des Promotors ist die Nach-Ernte-Produktion von Proteinen in Pflanzen im Rahmen des „Molecular Farming“. Es hat sich herausgestellt, daß einige Werk- und Wirkstoffe, z.B. Antikörper, in den herkömmlichen rekombinanten Wirtssystemen nicht effizient produziert werden können. Seit einigen Jahren bieten sich Pflanzen als neue Wirtssysteme an, so können z.B. scFv-Antikörper in transgenen Kartoffelknollen effektiv exprimiert werden (Artsaenko et al., 1998). Manche Fremdproteine könnten jedoch negative Auswirkungen auf die physiologische Konstitution der Pflanze haben und z.B. bei Toxizität deren Wachstum beeinträchtigen oder verhindern. Zudem ist nicht auszuschließen, daß beim Anbau von transgenen Pflanzen, die medizinisch aktive Proteine exprimieren, ein Gefährdungspotential für Organismen in der umgebenden Umwelt besteht. Deshalb bietet die Nach-Ernte-Produktion die Möglichkeit, Fremdproteine wirtschaftlich und umweltverträglich in Pflanzen zu produzieren. Von Cramer et al. (1999) wird ein solches

System beschrieben, bei dem die Proteinsynthese mit Hilfe eines wundinduzierbaren Promotors (Cramer und Weissenborn, 1997) in transgenen Tabakpflanzen erst nach der Ernte durch Zerkleinerung der Blätter induziert wird. Da der verwendete Promotor auch bei abiotischem und biotischem Streß induziert wird, ist damit kein sicheres Biocontainment zu schaffen. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens besteht in der schwer zu erreichenden gleichmäßigen Verteilung des Induktionsstimulus über die gesamte zu induzierende Pflanzenmasse. Mit dem Einsatz des *GapC4* Promotors in transgenen Kartoffeln bietet sich dagegen die Option, die Fremdproteinexpression sicher und effizient zu realisieren. Der Promotor wird weder durch Verwundung induziert, noch führt Dauerberegnung zur Induktion in Knollen (unveröffentlichte eigene Beobachtungen), was vermutlich daran liegt, daß die Knollen vom überirdischen Teil der Pflanze mit genügend Sauerstoff versorgt werden. Nach der Ernte kann der Promotor durch Begasung mit z.B. technischem Stickstoff in einem sicheren Behältnis kostengünstig, schnell und gleichmäßig induziert werden. Die Induzierbarkeit des *GapC4* Promotors in Knollen durch bakterielle Mazeration stellt bei der Realisierung eines sicheren Biocontainments für die Nach-Ernte-Produktion kein schwerwiegendes Problem dar, denn in mazeriertem pflanzlichen Gewebe findet keine Proteinexpression mehr statt, und bereits synthetisiertes Fremdprotein wird rasch abgebaut.

Der *GapC4* Promotor zeichnet sich zwar durch starke anaerobe Induzierbarkeit aus, doch die Expressionsstärke des 35S Promotors wird in Knollen nicht erreicht. Um die absolute Stärke eines Promotors zu erhöhen, bietet sich Promotor-Design an. Jüngst wurden Ergebnisse bekannt, daß eine 20 bp lange Sequenz in einem 50 bp großen Subfragment des *GapC4* Promotors essentiell für seine anaerobe Induzierbarkeit in Tabak ist (R. Geffers und R. Hehl, pers. Mitteilung). Durch Auffinden der beteiligten Transkriptionsfaktoren und Identifizierung weiterer regulatorischer Sequenzen wird es vielleicht möglich werden, die Stärke des *GapC4* Promotors gezielt zu steigern.

5 Zusammenfassung

Das phytopathogene Bakterium *Erwinia carotovora* gehört zu den bedeutendsten Krankheitserregern der Kartoffel, bei der es die Schwarzbeinigkeit und die Knollennaßfäule verursacht. Das Bakterium verbreitet sich in Kartoffelknollen bevorzugt unter sauerstoffarmen Bedingungen, da in diesem Zustand die pflanzeigenen Abwehrmechanismen weniger effektiv sind. Außerdem kann die Bildung eines Bakterien Schleims, der die Knolle beim Pathogenbefall überzieht, zu anaeroben Bedingungen durch Sauerstoffzehrung in der Knolle führen. Deshalb wurde eine gentechnische Resistenzstrategie entwickelt, welche die Expression von T4-Lysozym als antimikrobiellen Faktor gezielt unter anaeroben Bedingungen vorsieht. Zur anaeroben Fremdproteinsynthese wurde der Mais *GapC4* Promotor gewählt, der bereits in Tabak starke Induzierbarkeit durch Anaerobiose gezeigt hatte.

Zur Untersuchung des Induktionsverhaltens dieses Promotors in der Kartoffel wurden transgene *GapC4*-GUS Pflanzen hergestellt. Dabei stellte sich heraus, daß der Promotor unter anaeroben Bedingungen in allen Teilen der Pflanze stark induziert wird, während er aerob nicht aktiv ist. Nach der Infektion von Knollenscheiben mit *Erwinia carotovora* zeigte sich ebenfalls eine Induzierbarkeit des Promotors. Überraschenderweise wird die Induktion des Promotors dabei nicht von eventuell herbeigeführten anaeroben Bedingungen, sondern von der bakteriellen Infektion selbst verursacht, denn auch in luftumströmten infizierten Knollenscheiben wurde der Promotor aktiviert. Zudem beschränkte sich die Induktion des Promotors nicht nur auf infiziertes Knollengewebe, auch in benachbartem noch intaktem Gewebe wurden Signale festgestellt. Nachdem ausgeschlossen wurde, daß dies auf diffundierende β -Glucuronidase zurückzuführen war, ließ sich folgern, daß von der Infektionsstelle ausgehend ein mobiler Faktor freigesetzt wurde, der im Gewebe diffundierte und den Promotor induzierte. Diese Hypothese wurde erhärtet, da keine lebenden Bakterien notwendig sind, um den Promotor zu induzieren. Auch sterile *Erwinia*-Extrakte und aufgereinigte pektolytische Enzyme waren in der Lage, den Promotor in Knollenscheiben zu induzieren. Dabei ging die Promotorinduktion immer von mazeriertem Gewebe aus, so daß der mobile Faktor vermutlich beim Abbau der Zellwand entsteht oder freigesetzt wird.

Als Resistenzgenkonstrukt wurde der *GapC4* Promotor mit dem Gen für T4-Lysozym fusioniert. Die DNA-Sequenz des α -Amylase Signalpeptids aus Gerste wurde dem Gen

vorangestellt, um das Lysozym in den Interzellularraum zu sekretieren, wo der Angriff und die Vermehrung der Bakterien beginnt. Dieses Konstrukt wurde zur Transformation von Kartoffel eingesetzt. Zehn transgene Linien wurden ausgewählt und in fünf Knollenscheibentests auf Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* getestet. Dabei zeigten sich in vielen Linien signifikante Resistenzsteigerungen verglichen mit den Kontrollen. Bei einigen Linien wurde ein ähnlich gutes Resistenzverhalten im Vergleich zu einer Kontrolle mit erhöhter Resistenz festgestellt, bei der das T4-Lysozym unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert wird. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Linien nicht auf Expressionshöhe des T4-Lysozyms vorselektiert worden waren.

6 Literatur

- Adang, M. J., Brody, M. S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R. T., Shewmaker, C. K., Jones, A., Oakes, J. V., McBride, K. E. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIIIA gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* **21**: 1131-1145
- Allefs, S. J. H. M., Florack, D. E. A., Hoogendoorn, C., Stiekema, W. J. 1995. *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars transformed with a gene construct coding for antimicrobial peptide cecropin B is not altered. *Am. Potato J.* **72**: 437-445
- Allefs, S. J. H. M., de Jong, E. R., Florack, D. E. A., Hoogendoorn, C., Stiekema, W. J. 1996. *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars expressing antimicrobial peptide tachyplesin I. *Mol. Breed.* **2**: 97-105
- Anzai, H., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. 1989. Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 492-494
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U., Düring, K. 1998. Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* **4**: 313-319
- Bailey-Serres, J., Dawe, R. K. 1996. Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* **112**: 685-695
- Bailey-Serres, J., Kloeckner-Gruissem, B., Freeling, M. 1988. Genetic and molecular approaches to the study of the anaerobic response and tissue specific gene expression in maize. *Plant Cell Environ.* **11**: 351-357
- Bain, R. A., Pérombelon, C. M. 1988. Methods for testing potato cultivars for resistance to soft rot of tubers caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Pathol.* **37**: 431-437
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopath.* **33**: 299-321
- Banville, G. J. 1989. Yield loss and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Am. Potato J.* **66**: 821-834
- Barker, H. 1992. Potato leafroll. In: *Plant diseases of international importance. Vol. II. Diseases of vegetables and oil seed crops* (Eds. Chaube, H. S., Kumar, J., Mukhopadhyay, A. N., Singh, U. S.). Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall, Inc., 124-147
- Barras, F., Bortoli German, I., Bauzan, M., Rouvier, J., Gey, C. 1992. Stereochemistry of the hydrolysis reaction catalyzed by endoglucanase Z from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS Lett.* **300**: 145-148
- Bartels, R. 1971. Potato virus A. C. M. L. / A. A. B. Descript. *Plant Vir.* No. **54**
- Bartling, S., Wegener, C., Olsen, O. 1995. Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiology* **141**: 873-881
- Bercks, P. 1970. Potato virus X. C. M. I. / A. A. B. Descript. *Vir.* No. **4**

- Bishop, P. D., Markus, D. J., Pearce, G., Ryan, C. A. 1981. Proteinase-inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymatically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 3536-3540
- Bol, J. F., Linthorst, H. J. M., Cornelissen, B. J. C. 1990. Plant pathogenesis related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopath.* **28**: 113-138
- Boller, T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. J. L. Key and T. Kosuge, eds., Alan R. Liss, New York, 345-413
- Boman, H. G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell* **65**: 205-207
- Bongers, W. 1975. Aspects of hostplant relationship of the Colorado beetle. *Meded. Landbouwwhogesch. Wageningen* **70**: 77
- Bonhoff, A., Reith, B., Golecki, J., Grisbach, H. 1987. Race cultivar-specific differences in callose deposition in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Planta* **172**: 101-105
- Borkowska, M., Krzymowska, M., Talarczyk, A., Awan, M. F., Yakovleva, L., Kleczkowski, K., Wielgat, B. 1998. Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. *Z. Naturforsch.* **53**: 1012-1016
- Burton, W. G., Wigginton, M. J. 1970. The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. *Potato Res.* **13**: 150-186
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brücher, H. 1975. Domestikation und Migration von *Solanum tuberosum* L. *Kulturpflanze* **23**: 11-74
- Cappaert, M. R., Powelson, M. L., Franc, G. D., Harrison, M. D. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot *Erwinias* for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology* **78**: 1668-1672
- Carmona, M. J., Molina, A., Fernández, J. A., López-Fando, J. J., García-Olmedo, F. 1993. Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* **3**: 457-462
- Collinge, D. B., Slusarenko, A. J. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Mol. Biol.* **9**: 389-410
- Collmer, A., Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409
- Cooper, V. J. C., Salmond, G. P. C. 1993. Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: Evidence for an evolutionary "mix-and-match" of enzyme domains. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 341-350
- Cramer, H. H. 1967. Pflanzenschutz und Welternte. *Pflanzenschutz-Nachr. "Bayer"* **20**: 171-201

-
- Cramer, C. L., Boothe, J. G., Oishi, K. K. 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: Linking upstream and downstream strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **240**: 95-118
- Cramer, C. L., Weissenborn, D. L. 1997. HMG2 promoter expression system and post-harvest production of gene products in plants and plant cell cultures. US Patent Nr. 5,670,349
- Cromarty, R. W., Easton, G. D. 1973. The incidence of decay and factors affecting bacterial soft rot of potatoes. *Am. Potato J.* **50**: 398-407
- Cutt, J. R., Klessig, D. 1992. Pathogenesis-related proteins. In: Boller, T., Meins, F. (eds) *Plant Gene Research, genes involved in Plant Defense*, 209-243. Springer-Verlag, Wien
- Darvill, A. G., Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275
- Darvill, A. Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J.-J., Eberhard, S., Hahn, M. G., Ló, V.-M., Marfà, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neill, A. O., Spiro, M. D., van Halbeek, H., York, W. S., Albersheim, P. 1992. Oligosaccharins - oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants. *Glycobiology* **2**: 181-198
- Davis, K. R., Hahlbrock, K. 1987. Induction of defense responses in cultured plant cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **85**: 1286-1290
- Davis, K. R., Lyon, G. D., Darvill, A. G., Albersheim, P. 1984. Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **74**: 52-60
- De Boer, S. H., Kelman, A. 1978. Influence of oxygen concentration and storage factors on susceptibility of potato tubers to bacterial soft rot (*Erwinia carotovora*). *Potato Res.* **21**: 65-80
- De Bokx, J. A., Huttinga, H. 1981. Potato virus Y. C. M. I. / A. A. B. Descript. Vir. No. **242**
- De Bokx, J. A., Piron, P. G. M. 1981. Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Pl. Pathol.* **87**: 31-34
- De la Fuente-Martinez, J. M., Mosquada-Cano, G., Alvarez-Morales, A., Herrera-Estrella, L. 1992. Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/technology* **10**: 905-909
- Dennis, E. S., Gerlach, W. L., Walker, J. C., Lavin, M., Peacock, W. J. 1988. Anaerobically regulated aldolase gene of maize. A chimaeric origin? *J. Mol. Biol.* **202**: 759-767
- Diener, T. O., Raymer, W. B. 1971. Potato tuber spindle 'virus'. C. M. I. / A. A. B. Descr. Plant-paras. virus No. **66**
- Dixon, R. A., Harrison, M. J., Lamb, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopath.* **32**: 479-501
- Doares, S. H., Syrovets, T. Weiler, E. W., Ryan, C. A. 1995. Oligogalacturonides and chitosane activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4095-4098

- Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* **105**: 1075-1087
- Donegan, K. K., Schaller, D. L., Stone, J. K., Ganio, L. M., Reed, G., Hamm, P. B., Seidler, R. J. 1996. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. *Transgenic Res.* **5**: 25-35
- Düring, K. 1994. Differential patterns of bacteriolytic activities in potato in comparison to bacteriophage T4 and hen egg white lysozymes. *J. Phytopathol.* **141**: 159-164
- Düring, K. 1996. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Mol. Breeding* **2**: 379-305
- Düring, K., Mahn, A. 1999. Freisetzung und Resistenzprüfung transgener Lysozymkartoffeln. In: Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, 25.-26.5.1998, BBA Braunschweig (ed. J. Schiemann), Artefium Kulturdienstleistungen, Braunschweig, pp 39-44
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., Lörz, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.* **3**: 587-598
- Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W. 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.* **449**: 93-100
- Ebel, J., Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**: 1-36
- Ellis, J. G., Llewellyn, D. S., Dennis, E. S., Peacock, W. J. 1987. Maize *Adh-1* promoter sequences control anaerobic regulation: Addition of upstream elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* **6**: 11-16
- Farmer, E. E., Moloshok, T. D., Saxton, M. J., Ryan, C. A. 1991. Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**: 3140-3145
- Florack, D., Dirkse, W., Visser, B., Heidekamp, F., Stiekema, W. 1994. Expression of biologically active hordothionins in tobacco. Effects of pre- and pro-sequences at the amino and carboxyl termini of the hordothionin precursor on mature protein expression and sorting. *Plant Mol. Biol.* **24**: 83-96
- Florack, D., Allefs, S., Bollen, R., Bosch, D., Visser, B., Stiekema, W. 1995. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgen. Res.* **4**: 132-141
- Forrest, R. S., Lyon, G. D. 1990. Substrate degradation pattern of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls. *J. Exp. Bot.* **41**: 481-488
- Franke, G. 1980. Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen. Band I. S. Hirzel Verlag, Leipzig
- Franke, W. 1989. Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Gieffers, W., Paul, V. H., Ritter, E. 1989. Der Einfluß von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton,

- Merkmale zur Morphologie der Erregers und dessen Nachweis an Dikotyledonen. J. Phytopathol. **126**: 115-132
- Good, A., Paetkau, D. 1992. Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. Plant Mol. Biol. **19**: 693-697
- Gudmestad, N. C. 1994. Management of bacterial ring rot of potato. In: Zehnder, G. W., Powelson, M. L., Jansson, R. K., Raman, K. V. (eds.): Advances in potato pest. Biology and Management. APS Press, St. Paul, Min.: 127-135
- Gudmundsson, G. H., Lidhol, D. A., Asling, B., Gan, R., Boman, H. G. 1991. The cecropin locus: Cloning and expression of a gene encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. J. Biol. Chem. **266**: 11510-11517
- Hahlbrock, K., Scheel, D. 1987. Biochemical responses of plants to pathogens. In: Chet, I. (ed) Innovative Approaches to Plant Disease Control, pp. 229-254. John Wiley, New York
- Harrison, B. D. 1984. Potato leafroll virus. C. M. I. / A. A. B. Descript. Plant Vir. No. **291**
- Harrison, J. G. 1992. Effects on the aerial environment on late blight of potato foliage - a review. Pl. Pathol. **41**: 384-416
- Hawkes, J. G. 1944. Potato collecting expeditions in Mexico and South America. II: Systematic classification of the collections. Imp. Bureaux Plant Breed. Genet. II. Cambridge
- He, S. Y., Collmer, A. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-galacturonosidase encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC 16. J. Bacteriol. **172**: 4988-4995
- Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M. B., Erikson, A., Mäe, A., Koiv, V., Palva, E. T. 1995. Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Mol. Plant-Microb. Interactions **2**: 207-217
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A., Reschke, M. 1993. Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau. 3. erw. Auflage DLG Verlag Frankfurt (Main), BLV-Verl.-Ges. München, Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, Österreichischer Agrarverlag Wien, Bugra Suisse Wabern-Bern
- Higgs, D. C., Barnes, L. J., Colbert, J. T. 1995. Abundance and half-life of the distinct oat phytochrome A3 and A4 mRNAs. Plant Mol. Biol. **29**: 367-377
- Hinton, J. C. D., Sidebottom, J. M., Hyman, L. J., Pérombelon, M. C., Salmond, G. P. C. 1989. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* exhibiting reduced virulence. Mol. Gen. Genet. **217**: 141-148
- Hinton, J. C. D., Gill, D. R., Lalao, D., Plastow, G. S., Salmond, G. P. S. 1990. Sequence of the *peh* gene of *Erwinia carotovora*: Homology between *Erwinia* and plant enzymes. Molecular Microbiol. **4**: 1029-1036
- Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 1998. Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. Genetics **149**: 479-490

- Holley, J. D., Hofstra, G., Hili, R. 1985. Appearance and fine structure of lesion caused by the interaction of ozone and *Alternaria solani* in potato leaves. *Canad. Journ. Pl. Pathol.* **7**: 277-282
- Honma, M. A., Baker, B. J., Waddell, C. S. 1993. High-frequency transposition of Ds-ALS in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6242-6246
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., Hoekema, A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen. Res.* **2**: 208-218
- Horsch, R., Fry, J., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231
- Hoson, T. 1991. Structure and function of plant cell walls: Immunological approaches. *Intl. Rev. Cytol.* **130**: 233-269
- Hunter, R. E. 1974. Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. *Physiol. Pl. Pathol.* **4**: 151-159
- Jager, G., Velvis, H., Lambers, J. G., Mulder, A. Roosjen, J. 1991. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. *Potato Research* **34**: 269-284
- Jaynes, J. M., Nagpala, P., Destefano-Beltran, L., Hong-Hung, J., Kim, J., Denny, T., Cetiner, S. 1993. Expression of a cecropin B lytic peptide analogue in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Sci.* **8**: 43-53
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimaric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- Jongedijk, E., de Schutter A. A., Stolte, T., van den Elzen, P. J., Cornelissen, B. J. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Biotechnology* **10**: 422-429
- Keen, N. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B., Belser, W., 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 825-831
- Kelley, P., Freeling, M. 1984a. Anaerobic expression of maize fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **259**: 14180-14183
- Kelley, P., Freeling, M. 1984b. Anaerobic expression of maize glucose phosphate isomerase I. *J. Biol. Chem.* **259**: 673-677
- Kelman, A., Baughn, J. W. Maher, E. A. 1978. The relationship of bacterial soft rot susceptibility to water status of potato tubers. *Phytopathol. News* **12**: 178
- Kennedy, R., Rumpho, M., Fox, T. 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* **100**: 1-6
- Kersanach, R., Brinkmann, H., Liaud, M.-F., Zhang, D.-X., Martin, W. F., Cerff, R. 1994. Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* **367**: 387-389

- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol. 2 (Mount, M. S. and Lacy, G. H. eds.). New York, Academic Press, 149-177
- Kolbe, W. 1970. Einfluß direkter Saugschäden bei starkem Blattlausbefall auf den Kartoffelertrag. *Pflanzenschutz-Nachr.* **23**: 282-291
- Koncz, C., Schell, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396
- Koncz, C., Olsson, O., Langridge, W. H. R., Schell, J. 1987. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 131-135
- Kotoujansky A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 405-430
- Köhler, U., Liaud, M.-F., Mendel, R. R., Cerff, R., Hehl, R. 1995. The maize *GapC4* promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 1293-1298
- Köhler, U., Mendel, R. R., Cerff, R., Hehl, R. 1996. A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco. *Plant J.* **10**: 175-183
- Körber-Grohne, U. 1987. *Nutzpflanzen in Deutschland: Kulturgeschichte und Biologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Kyozuka, J., Fujimoto, H., Izawa, T., Shimamoto, K. 1991. Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 40-48
- Langerfeld, E. 1989. Die bakterielle Ringfäule der Kartoffel (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Davies et al.) aus biologischer, epidemiologischer, ökologischer und ökonomischer Sicht. Eine Literaturstudie. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pfl-schutzd.* **41**: 153-159
- Lapwood, D. H., Wellings, L. W., Hawkins, J. H. 1973. Irrigation as a practical means to control potato common scab (*Streptomyces scabies*): Final experiments and conclusions. *Pl. Pathol.* **22**: 35-41
- Laszlo, A., St Lawrence, P. 1983. Parallel induction of PDC and ADH in anoxic maize roots. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 110-117
- Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., Bertheau, Y. 1993. Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene* **131**: 17-25
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., Tumer, N. E. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology* **8**: 127-134
- Laxalt, A. M., Cassia, R. O., Sanllorenti, P. M., Madrid, E. A., Andreu, A. B., Daleo, G. R., Conde, R. D., Lamattina, L. 1996. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol. Biol.* **30**: 961-972

- Lelliott, R. A., Stead, D. 1987. Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Li, R., Wu, N., Fan, Y., Song, B. 1999. Transgenic potato plants expressing osmotin gene inhibits fungal development in inoculated leaves. *Chin. J. Biotechnol.* **15**: 71-75
- Lipton, W. J. 1967. Some effects of low-oxygen atmospheres on potato tubers. *Am. Potato J.* **44**: 292-299
- Lojkowska, E., Kelman, A. 1994. Comparison of the effectiveness of different methods of screening for bacterial soft rot resistance of potato tubers. *Am. Potato J.* **71**: 99-113
- Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F., Fernandez, I. G. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 7860-7865
- Lund, B. M., Nicholls, J. C. 1970. Factors influencing the soft rotting of potato tubers by bacteria. *Potato Res.* **13**: 210-214
- Lund, B. M., Wyatt, G. M. 1972. The effect of oxygen and carbon dioxide concentrations on bacterial soft rot of potatoes. I. King Edward potatoes inoculated with *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Potato Res.* **15**: 174-179
- Majeau, N., Trudel, J., Asselin, A. 1990. Diversity of cucumber chitinase isoforms and chracterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant. Sci.* **68**: 9-16
- Malnoe, P., Farinelli, L., Collet, G. F., Reust, W. 1994. Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Mol. Biol.* **25**: 963-975
- Manjunath, S., Sachs, M. M. 1997. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Mol. Biol.* **33**: 97-112
- Martinez, P., Martin, W., Cerff, R. 1989. Structure, evolution and anaerobic regulation of a nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Biol.* **208**: 551-565
- Matzk, A., Mantell, S., Schiemann, J. 1996. Localization of persisting *Agrobacteria* in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 373-381
- Mazau, D., Esquerré-Tugayé, M. T. 1986. Hydroxyprolin-rich glycoprotein accumulation in the plant cell wall of plants infected by various pathogens. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **29**: 147-157
- McInroy, J. A., Kloepper, J. W. 1994. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs (eds) O’Gara, F., Dowling, D. N., Boesten, B. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Molina, J. J., Harrison, M. D. 1977. The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg. I. Relationship of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *Am. Potato J.* **54**: 587-591

- Moloshok, T., Pearce, G., Ryan, C. A. 1992. Oligogalacturonide signaling of proteinase inhibitor genes in plants: Structure-activity relationships of di- and trigalacturonic acids and their derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**: 731-734
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**: 473-497
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., Manners, J., M. 1990. Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS* **67**: 325-328
- Nielson, L. W. 1968. Accumulation of respiratory CO₂ around potato tubers in relation to bacterial soft rot. *Am. Potato J.* **45**: 179-181
- Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., Destefano-Beltran, J., Jaynes, J. M. 1994. Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* **77**: 123-128
- Norman, C., Vidal, S., Palva, E. T. 1999. Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12** :640-644
- Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-812
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., Bowles, D. J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914-1917
- Olszewski, N. E., Martin, F. B., Ausubel, F. M. 1988. Specialized binary vector for plant transformation: Expression of the *Arabidopsis thaliana* AHAS gene in *Nicotiana tabacum*. *Nucleic Acids Research* **16**: 10765-10782
- Palva, T. K., Holmström, K. O., Heino, P., Palva, E. T. 1993. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 190-196
- Peferoen, M. 1997. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends Biotechnol.* **15**: 173-177
- Pellegrini, A., Thomas, U., von Fellenberg, R., Wild, P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 180-187
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Hunziker, P., von Fellenberg, R. 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 372-378
- Pelletier, J. R., Fry, W. E. 1989. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: Incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* **79**: 511-517
- Perata, P., Alpi, A. 1993. Plant responses to anaerobiosis. *Plant Sci.* **93**: 1-17
- Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Bieber, D., Fischhoff, D.A. 1993. Genetically

- improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* **22**: 313-321
- Pérombelon, M. C. M. 1973. Sites of contamination and numbers of *Erwinia carotovora* present in stored seed potato stocks in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* **74**: 59-65
- Pérombelon, M. C. M., Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 361-387
- Pérombelon, M. C. M., Lowe, R. 1975. Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. *Potato Res.* **18**: 64-82
- Persson, P. 1988. Blackleg and stem rot of potatoes in Sweden. *Acta Agri. Scand.* **38**: 177-182
- Pijnacker, L. P., Ferwerda, M. A., Puite, K. J., Schaart, J. G. 1989. Chromosome elimination and mutation in tetraploid somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports* **8**: 82-85
- Pirhonen, M., Saarilathi, H., Karlsson, M. B., Palva, E. T. 1991. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 276-283
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E. T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* **12**: 2467-2476
- Pittis, J. E., Shattock, R. C. 1994. Viability, germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. *Pl. Pathol.* **43**: 387-396
- Powelson, M. L., Apple, J. D. 1984. Soil and seed tubers as source of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. *Phytopathology* **74**: 429-432
- Presting, G. G., Smith, O.P., Brown, C. R. 1995. Resistance of potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology* **85**: 436-442
- Preston, J. F., Rice, J. D., Ingram, L. O., Keen, N. T. 1992. Differential depolymerization mechanisms of pectate lyases secreted by *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **174**: 2039-2042
- Ramsey, G. B., Lutz, J. M., Werner, H. O., Edgar, A. D. 1944. Experiments on shipping washed early potatoes. *Bull. Neb. Exp. Sin.* **364**
- Reymond, P., Grunberger, S., Paul, K., Muller, M., Farmer, E. E. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: Large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4145-4149
- Rieckmann, W. 1991. Zur Problematik der Eingrenzung nichtpersistenter Viren und ihrer Vektoren im Pflanzkartoffelbau. *Ges. Pflanzen* **43**: 155-159
- Rogers, J. C., Milliman, C. 1983. Isolation and sequence analysis of a barley alpha-amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **258**: 8169-8174
- Rothacker, D. 1961. Die wilden und kultivierten mittel- und südamerikanischen Kartoffelspecies einschließlich der im Süden der USA vorkommenden Arten. In: Schick, R., Kinkowski, M. *Die Kartoffel*. Berlin

- Rozendaal, A., Brust, J. H. 1954. The significance of potato virus S in seed potato culture. Proc. 2nd Conf. Potato Vir. Disease, Lisse-Wageningen, 1954: 120-132
- Rozendaal, A., van Slogteren, D. H. M. 1957. A potato virus identified with potato virus M and its relationship with potato virus S. Proc. 3rd Conf. Potato Vir. Disease, Lisse-Wageningen, 1957: 30-36
- Rössner, J. 1987. Fungi as antagonists of *Globodera rostochiensis*. Nematologica **33**: 106-118
- Russell, D. A., Sachs, M. M. 1989. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. Plant Cell **1**: 793-803
- Russell, D. A., Sachs, M. M. 1992. Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. Plant Physiol. **99**: 615-620
- Ryan, C. A. 1988. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. Biochemistry **27**: 8879-8883
- Sachs, M. M., Freeling, M., Okimoto, R. 1980. The anaerobic proteins of maize. Cell **20**: 761-767
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Salaman, R. N. 1954. The origin of the early European potato. J. Linn. Soc. **55**: 185-190
- Scholey, J., Marshall, C., Whitbread, R. 1968. A pathological problem associated with pre-packing of potato tubers. Plant Pathol. **17**: 135-139
- Sequeira, L. 1978. Lectins and their role in host-pathogen specificity. Annu. Rev. Phytopathol. **16**: 453-469
- Shtienberg, D., Fry, W. E. 1990. Field and computer simulation evaluation of spray-scheduling methods for control of early and late blight in potato. Phytopathology **80**: 772-777
- Sikora, R., Hiemer, A., Schuster, R.-P. 1990. Reflections on the complexity of fungal infection of nematode eggs and the importance of facultative perthophytic fungal pathogens in biological control of *Globodera pallida*. Med. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent **22**: 669-712
- Simpson, S. D., Ashford, D. A., Harvey, D. J., Bowles, D. J. 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. Glycobiology **8**: 579-583
- Sinden, S. L., Kobayashi, R. S., Nordeen, R. O. 1993. Perspectives on controlling potato soft rot with foreign genes for antibacterial compounds. Acta Horticulturae **336**: 79-83
- Springer, B., Werr, W., Starlinger, P., Bennett, D., Zokolica, M. 1986. The *Shrunken* gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. Mol. Gen. Genet. **205**: 461-468
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., Batterman, J. 1995. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. Biotechnology **13**: 1085-1089

- Tong, C. B., Labavitsch, J. M., Yang, S. F. 1986. The induction of ethylene production from pear cell culture by cell wall fragments. *Plant Physiol.* **81**: 929-930
- Trudel, J., Audy, P., Asselin, A. 1989. Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthi-nc tobacco healthy and infected with tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **2**: 315-124
- Uritani, I., Asahi, T. 1980. Respiration and related metabolic activity in wounded and infected tissues. In: Stumpf, P. K., Conn, E. E. (eds) *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*. Vol. 2: Metabolism and respiration. Academic Press, New York, pp.463-485
- van den Elzen, P. J., Huisman, M. J., Willink, D. P., Jongedijk, E., Hoekema, A., Cornelissen, B. J. 1989. Engineering virus resistance in agricultural crops. *Plant Mol. Biol.* **13** 337-346
- van Emden, H. F., Eastop, V. F., Hughes, R. D., Way, M. 1979. The Ecology of *Myzus persicae*. *Ann. Rev. Entomol.* **14**:197-270
- Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 259-288
- Varner, J. E., Lin, L. S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* **56**: 231-239
- Vidal, S., Eriksson, A. R. B., Montesano, M., Denecke, J., Palva, E. 1998. Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-dependent induction of a plant defense response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 23-32
- Vidal, S., Ponce de León, I., Denecke, J., Palva, E. T. 1997. Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. *Plant J.* **11**: 115-123
- Walker, D. 1992. Potato brown rot, *Pseudomonas solanacearum*. *Pl. Disease Notice. Centr. Sci. Lab. Harpenden, Herts Nr.* **73**
- Weber, J., Olsen, O., von Wettstein, D. 1994. Digalacturonates induce defense against soft rot in potato tubers. In: *Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Edinburgh (Abstracts), p. 112
- Weber, J., Olsen, O., Wegener, C., von Wettstein, D. 1996. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**: 389-401
- Wegener, C., Bartling, S., Olsen, O., Weber, J., von Wettstein, D. 1996. Pectate lyase in transgenic potatoes confers pre-activation of defence against *Erwinia carotovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 359-376
- Weidemann, H. L. 1986. Die Ausbreitung der Kartoffelviren S und M unter Feldbedingungen. *Potato Res.* **29**: 109-118
- Wharam, S., Mulholland, V., Salmond, G. P. C. 1995. Conserved virulence factor regulation and secretion apparatus in bacterial pathogens of plants and animals. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 1-13
- Wigginton, M. J. 1974. Effects of temperature, oxygen tension and relative humidity on the wound healing process in the potato tuber. *Potato Res.* **17**: 200-214

-
- Winkler, T. 1998. Entwicklung monoklonaler, inhibierender Antikörper gegen Pathogenitätsfaktoren des phytopathogenen Bakteriums *Erwinia* spp. 1. Auflage, Shaker Verlag, Aachen
- Workman, M., Twomey, J. 1969. The influence of storage atmosphere and the temperature on the physiology and performance of 'Russet Burbank' seed potatoes. J. Am. Soc. Hort. Sci. **94**: 260-263
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C., Shah, D. M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. Plant Cell **7**: 1357-1368
- Xu, H., Khalilian, H., Eweida, M., Squire, S., Abouhaidar, G. M. 1995. Genetically engineered resistance to potato virus X in four commercial potato cultivars. Plant Cell Reports **15**: 91-96
- Yang, Z., Cramer, C. L., Lacy, G. H. 1989. System for simultaneous study of bacterial and plant gene expression in soft rot of potato. Mol. Plant-Microbe Interact. **2**: 195-201
- Yang, Z., Cramer, C. L., Lacy, G. H. 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes: *In planta* gene activation and roles in soft-rot pathogenesis. Mol. Plant-Microbe Interact. **5**: 104-112
- Yang, Y., Kwon, H. B., Peng, H. P., Shih, M. C. 1993. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **101**: 209-210
- Zink, R. T. 1991. Pathogen detection in seed potatoes. Am. Potato J. **68**: 103-106

